台灣農業研究
JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH
Vol.72 No.3 2023

Feature Article

181 Application of Multiple Gene Editing in Plant Precision Breeding
Yi-Wen Wang, Han-Wei Chen, Shuen-Chi You, Jau-Yueh Wang, and Da-Gin Lin

Research Articles

197 Taxonomic Review of the Genus *Phola* Weise, 1890 (Coleoptera: Chrysomelidae: Chrysomelinae)
Chi-Feng Lee and Michael F. Geiser

219 Natural Occurrence and Selection of *Beauveria bassiana* Isolates in Coffee Berry Borers in Taiwan
Po-Hung Chen, Yu-Ping Liang, and Hui-Fang Ni

237 Effects of Different Intensities and Time Treatments of High-Voltage Electrostatic Field on the Seed Germination of Varied Varieties of Rootstock Eggplant
Yi-Jing Chen, Chwen-Ming Yang, and Kai-Ying Chiu

255 Effects of Different Concentrations of Osmotic Treatment on the Seed Germination of Varied Varieties of Rootstock Eggplant at Low Temperature
Yi-Jing Chen, Chwen-Ming Yang, and Kai-Ying Chiu

267 Study on the Pathway of Infection by Pathogen of Oriental Cymbidiums Pseudobulb Rot
Chiao-Wen Huang, Jin-Hsing Huang, Yi-Ching Li, Chun-Wei Chen, Szu-Lun Lai, and Ting-Fang Hsieh

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Ministry of Agriculture
ISSN 2790-086X
9 772790 086007

台灣農業研究 JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH Vol.72 No.3 2023

ISSN 2790-086X
DOI:10.6156/JTAR

台灣農業研究
JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH
Vol.72 No.3 2023

專題論述

181 多重基因編輯於作物精準育種之應用
王怡雯、陳涵葳、游舜期、王昭月、林大鈞

研究報告

197 瘦金花蟲屬 (*Phola* Weise, 1890) 的分類回顧
(鞘翅目：金花蟲科：金花蟲亞科)
李奇峰、Michael F. Geiser

219 台灣本土白殭菌於咖啡果小蠹之田間自然感染率及菌株篩選
陳柏宏、梁鈺平、倪蕙芳

237 比較高壓靜電場不同強度及時間處理對不同品種砧木茄子種子之影響
陳怡菁、楊純明、邱凱瑩

255 不等滲調處理濃度對不同品種砧木茄子種子在低溫發芽之影響
陳怡菁、楊純明、邱凱瑩

267 小花蕙蘭假球莖腐敗病菌感染途徑之研究
黃巧雯、黃晉興、李怡靜、陳純葳、賴思倫、謝廷芳

農業部農業試驗所出版

《台灣農業研究》編審會

總編輯

謝廷芳／農業試驗所主任祕書室

副總編輯

石憲宗／農業試驗所應用動物組

領域主編 (按筆劃序)

王強生／國立中興大學農藝學系
古新梅／國立中興大學農藝學系
安寶貞／農業試驗所植物病理組
呂秀英／苗栗區農業改良場
杜宜殷／國立台灣大學園藝暨景觀學系
林彥蓉／國立台灣大學農藝學系
林慧玲／國立中興大學園藝學系
侯豐男／國立中興大學昆蟲學系
陳右人／國立台灣大學園藝暨景觀學系
陳世銘／國立台灣大學生物產業機電工程學系
陳健忠／農業試驗所應用動物組
陳琦玲／農業試驗所農業化學組
張永和／私立靜宜大學食品營養系
張瑞璋／農業藥物試驗所
莊愷瑋／國立嘉義大學農藝學系
郭寶錚／國立中興大學農藝學系
黃炳文／國立中興大學應用經濟學系
黃振文／國立中興大學植物病理學系
黃裕銘／國立中興大學土壤環境科學系
黃肇家／農業試驗所作物組
楊正澤／國立中興大學昆蟲學系
楊純明／私立明道大學精緻農業學系
路光暉／國立中興大學昆蟲學系
鄒裕民／國立中興大學土壤環境科學系
劉力瑜／國立台灣大學農藝學系
蔡致榮／農業試驗所
鍾文鑫／國立中興大學植物病理學系
顏國欽／國立中興大學食品暨應用生物科技學系

邀請領域主編

楊靜瑩／國立中興大學農藝學系

英文主編 (按筆劃序)

王寅東／美國德州農工大學
張宗仁／美國喬治亞大學
楊景程／美國佛吉尼亞理工大學
鍾光仁／國立中興大學植物病理學系

編輯助理

王立蓉／《台灣農業研究》期刊編輯室
黃鈺君／《台灣農業研究》期刊編輯室

台灣農業研究

第七十二卷　第三期　　中華民國一一二年九月三十日

出版者　農業部農業試驗所
發行人　林學詩
總編輯　謝廷芳
地址　413008 台中市霧峰區萬豐里中正路 189 號
網址　https://www.tari.gov.tw/jtar
電話　(04)2331-7236
E-mail　jtar@tari.gov.tw
線上投審稿系統　https://www.ipress.tw/J0042

編印　華藝學術出版部
地址　234634 新北市永和區成功路一段 80 號 18 樓
電話　(02)2926-6006
E-mail　press@airiti.com

定價　新台幣一七五元
展售門市　1. 國家書店 / 104472 台北市松江路 209 號 1 樓 / 電話 : (02)2518-0207
國家網路書店 http://www.govbooks.com.tw
2. 五南文化廣場 / 400002 台中市中山路 6 號 / 電話 : (04)2226-0330

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 72(3):181–196 (2023)
DOI:10.6156/JTAR.202309_72(3).0001 **專題論述**

多重基因編輯於作物精準育種之應用

王怡雯 [1,**] 陳涵葳 [2,**] 游舜期 [2] 王昭月 [2] 林大鈞 [3,*]

摘要

王怡雯、陳涵葳、游舜期、王昭月、林大鈞。2023。多重基因編輯於作物精準育種之應用。台灣農業研究 72(3):181–196。

多重基因編輯是新興精準育種的高效率工具之一，由於可以同時編輯基因組中 2 個或多個不同的 DNA 位點，故適用於數量性狀基因或同源基因家族所調控重要性狀之探勘。操作多重基因編輯的系統可概略分成 ZFNs、TALENs 及 CRISPR/Cas 三種系統，其中以 CRISPR/Cas 操作較為簡單、編輯效率較高以及具有成本較低的優勢，因此成為目前主流。本篇主要介紹以 CRISPR/Cas 為基礎，進而發展出的多重基因編輯系統。文中另將針對編輯目的、載體構築表現系統、多 gRNA 表現方式，以及在水稻、小麥、玉米、油菜、番茄及馬鈴薯等糧食與經濟作物的成功實例加以說明，冀能作為研究人員進行相關研究之參考依據。

關鍵詞：多重基因編輯、精準育種、數量性狀基因、同源基因。

前言

當前全球人口數約為 80 億，預估 2050 年可能成長至 97 億，糧食生產需提升 70–85% 才能供應所需 (Zafar *et al*. 2020)。然而近年因為氣候變遷頻繁發生，農業生產地區受到暴雨或乾旱的肆虐，造成糧食產量下降、供應緊縮及產品價格波動劇烈等問題；歐盟執委會於 2021 年發表新興基因技術 (new genomic techniques) 研究報告，認為基因編輯技術有助達成糧食永續生產的目標 (Zimny 2022)。基因編輯技術可針對特定序列進行敲除 (knockout)、敲入 (knock-in)、替換 (replacement) 或定點突變 (point mutation)，實現精準育種 (precision breeding) 的目標，如 Lusser 等學者的定義，屬於新興植物育種技術 (new plant breeding techniques; NPBT) (Lusser *et al*. 2011; Enfissi *et al*. 2021)。常用的基因編輯工具包括 zinc finger nucleases (ZFNs)、transcription activator-like effector nucleases (TALENs)，以及 clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein (Cas)，簡稱 CRISPR/Cas 等。ZFNs 與 TALENs 是基於蛋白質的核酸酶系統 (protein-based nuclease system)，分為 2 個結構域 (domain)，ZF 結構域或 TALE 結構域負責與目標核酸序列辨識結合，再由核酸酶結構域負責切割，ZFNs 或 TALENs 不論在設計、操作彈性、編輯效率、專一性及成本上皆不如 CRISPR/Cas 系統簡單有效 (Ho *et al*. 2018)。CRISPR/Cas 系統是基於核糖核酸與蛋白質的系統 (RNA-protein based system)，引導 RNA (guide RNA; gRNA) 負責辨識目標序列，Cas9 核酸酶負責切割，gRNA 分成 CRISPR RNA (crRNA) 與 trans-activating crRNA (tracrRNA) 2 個部分，其中 crRNA 是 1 段與目標序列互補的 17–20 nt 序列，tracrRNA 主要功能是修飾 pre-crRNA 形成具功能之成熟 crRNA，並與 Cas9 核酸酶形成複合體，為了方便操作，利用人工合成的

投稿日期：2023 年 1 月 6 日；接受日期：2023 年 5 月 7 日。
* 通訊作者：dagin@tari.gov.tw
** 王怡雯與陳涵葳並列第一作者。
[1] 農業部農業試驗所遺傳資源及生物技術組聘用助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農業部農業試驗所遺傳資源及生物技術組助理研究員。台灣 台中市。
[3] 農業部農業試驗所遺傳資源及生物技術組聘用副研究員。台灣 台中市。

方式將 crRNA 與 tracrRNA 合併，成為 single gRNA (sgRNA)，即可引導 Cas9 核酸酶進行編輯，由於 sgRNA 設計簡便定位精準，使得 CRISPR/Cas 系統具有高效率低成本的優勢 (Cao *et al*. 2016)。此外，與 ZFNs 或 TALENs 相比，CRISPR/Cas 系統可表現單一 Cas 核酸酶與多種 sgRNA，同時進行多個序列位置的編輯 (Chen *et al*. 2019)，進而使 CRISPR/Cas 技術不再侷限於單一引導位點 (mono-guide) 而可針對多個位點，進行多基因編輯策略 (multiplexed CRISPR strategies)，故此技術已逐漸成為數量基因功能探勘與精準育種應用的顯學 (McCarty *et al*. 2020)。通常，作物的重要性狀，如生物或非生物逆境抗性、產量及品質等，多為數量性狀。而多重基因編輯的優勢在於「同時」編輯多個目標基因，實現前揭重要作物數量性狀的表現。因此，本文將就多重基因編輯之目的、多重基因編輯之策略及其在育種上之應用進行介紹，冀能作為研究人員進行相關研究之參考依據。

多重基因編輯之目的

多重基因編輯的優勢在於同時編輯多個基因標的，而可應用於下列 3 大主軸：

合成生物學 (synthetic biology)

合成生物學是結合生理學與工業生產原理，以人為方式改變多個目標基因之表現，包括過量表現、降低表現及敲除等，進而調控內生代謝迴路。目前 CRISPR/Cas 系統可搭配蛋白質融合技術，在核酸酶功能缺陷的 Cas 蛋白質上結合蛋白質活化結構域 (activation domain) 或蛋白質抑制結構域 (repression domain)，產生多種功能的 CRISPR，如 CRISPRa 具有轉錄活化功能、CRISPRi 具有轉錄抑制功能。Lian *et al*. (2017) 在酵母菌中測試 dSpCas9、dSaCas9、dSt1Cas9 及 dLbCpf1 等缺陷型 Cas 蛋白質，與不同功能之蛋白質結構域結合之效果，開發 CRISPR-AID 系統。該系統包含 dLbCpf1-VP、dSpCas9-RD1152 及 SaCas9 三種功能型核酸酶模組，可分別對目標基因進行轉錄活化、轉錄干擾及基因功能刪除。如已知酵母菌可利用甲羥戊酸途徑 (mevalonate pathway) 產生 β-胡蘿蔔素，其中 HMG1 是羥甲基戊二酸單醯輔酶 A 還原酶 (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase)、EGR9 可催化焦磷酸金合歡酯 (farnesyl pyrophosphate; FPP) 合成角鯊烯 (squalene)，另有 ROX1 轉錄因子抑制多種甲羥戊酸途徑酵素表現，應用 CRISPR-AID 系統強化酵母菌 β-胡蘿蔔素生合成代謝工程，同時提升菌株之 *HMG1* 基因表現、抑制 *ERG9* 基因表現，並刪除 *ROX1* 基因功能，胡蘿蔔素生合成量可增加 2.8 倍 (Lian *et al*. 2017)。

數量性狀之研究

在農業生產中，產量、品質、抗性及抗旱等重要性狀主要由數量性狀基因座 (quantitative trait loci; QTL) 所控制。這些數量性狀多由多個基因所調控，每個基因對性狀均有一定影響程度，這些控制性狀之基因稱為多基因 (polygenes)。由於每個 QTL 在相互作用時，對外表型貢獻較小。因此，利用傳統育種需經多個世代進行 QTLs 的堆疊，且過程中常須進行大量後裔族群選拔的工作，方有機會挑選出具有目標性狀且排除遺傳累贅的個體 (Gao 2021)。利用多重基因編輯技術，可快速有效解決數量性狀之育種。

基因家族之研究

透過全基因組重複 (whole genome duplication; WGD) 與單基因重複 (single-gene duplication; SGD) 等方式，將基因移動或複製到新的位置，造成植物基因組在大小、組成及複雜性方面展現極大的多樣性 (Qiao *et al*. 2019)。基因家族是一群具有相似結構特性與生化功能的蛋白質，具有共同的起源，物種經過 WGD、SGD 或串聯重複 (tandem duplication)、近端重複 (proximal duplication)、轉位子重複 (transposed duplication) 及分散重複 (dispersed duplication) 等方式，而植物對環境的適應使得這些基因在不同物種間有顯著的差異，包括新功能的分化與功能冗餘 (redundancy)，有助對抗環境變化 (Fang *et al*. 2022)。由於基因家族具有序列保守性，利用 CRISPR/Cas 系統可同時編輯多個基因家族成員，

針對重要植物基因家族進行系統性的功能性研究。

多重基因編輯之策略

多重基因編輯載體構築

雙元件轉錄單位 (two-component transcriptional unit; TCTU) 系統

雙元件轉錄單位系統是將 Cas 核酸酶與 gRNAs 分開表現的一種載體構築系統 (圖 1A)，前者可由第二型 RNA 聚合酶啟動子 (RNA polymerase II, Pol II) 驅動，但小片段 gRNA(s) 則可選擇 Pol II 啟動子或第三型 RNA 聚合酶 (Pol III) 啟動子驅動 (Lowder *et al*. 2016)。依照啟動子種類的組合，TCTU 系統又可再分成 Pol II 與 Pol III 混合雙元啟動子 (mixed dual promoter)，或 Pol II 雙元啟動子 2 種型式 (Ren *et al*. 2019)。Pol III 啟動子的優點包括通泛性 (ubiquitously) 與持續性 (constitutively)，適合小片段 RNA 表現，但其缺點則是無法進行表現時期與表現位置的調控。如進行多重基因編輯時，載體中若需要放入多個 Pol III 啟動子，而且在非模式植物系統，不同物種來源的 Pol III 表現量可能不如預期 (Tang *et al*. 2016)。此外，重複使用相同啟動子容易造成基因默化現象 (Belele *et al*. 2013)，或影響轉殖基因的穩定性 (Peremarti *et al*. 2010)。而 Cas 核酸酶與 gRNA 無選擇性的過度表現，也會提高脫靶效應的發生率，導致目標基因的編輯效率降低 (Mikami *et al*. 2015) (表 1)。

單元件轉錄單位 (single transcriptional unit; STU) 系統

單元件轉錄單位系統之特點是由單一啟動子同時驅動 Cas 核酸酶與 gRNA(s) 的表現 (圖 1B)，可減少 CRISPR/Cas 基因編輯載體過大的限制，同時可使用各種誘導型的 Pol II 啟動子，便於特定部位或特定時期進行誘導型的編輯，並可分別在水稻與動物細胞中順利進行多基因編輯 (Yoshioka *et al*. 2016; Ding *et al*. 2018; Xu *et al*. 2019)。簡化單元件轉錄單位 (simplified STU; SSTU) 系統，則是應用 Cpf1 之 pre-crRNA 截切原理設計，減少載體構築時 gRNA(s) 的截切元件，與 TCTU 相比更容易構築，且可利用病毒載體進行轉殖 (Wang *et al*. 2018)。不過，由於 STU 與 SSTU 的構築策略，使轉錄單位相當緊湊靠近，這樣緊湊的結構有可能影響個別轉錄單位的表現量。此外，STU 與 SSTU 系統的設計為 1 個 Cas 核

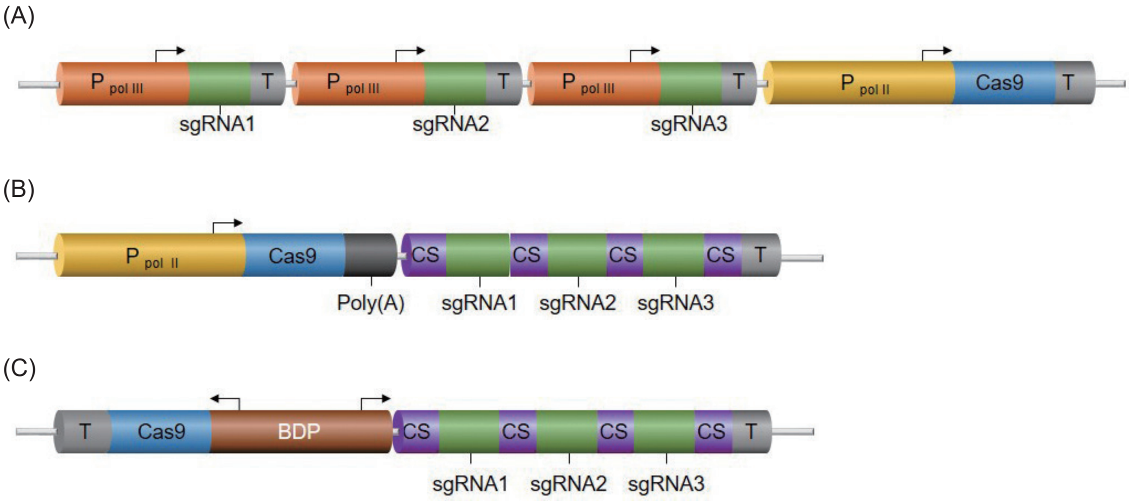


圖 1. 多重基因編輯載體構築。(A) 雙元件轉錄單位系統；(B) 單元件轉錄單位系統；(C) 雙向啟動子表現系統。

Fig. 1. Vector construction of multiple gene edition. (A) Two-component transcriptional unit (TCTU); (B) sigle transcriptional unit (STU); and (C) bidirectional promoter (BDP). Pol III promoter: RNA polymerase III promoter; Pol II promoter: RNA polymerase II promoter; CS: cleavage site; T: terminator; PolyA: poly A tail (McCarty *et al*. 2020).

表 1. 多重基因編輯策略之比較。
Table 1. Comparisions of multiple gene editing strategy.

System[z]	Advantages	Disadvantages	Editing efficiency	References
TCTU	-common system	-gene silencing -poor efficiency -High off-target	low	Belele *et al*. (2013); Peremarti *et al*. (2010); Mikami *et al*. (2015)
STU	-common system -conditional -simple -highly active system	-Unequal distribution of Cas and gRNA(s) expression -poor efficiency	low	Ren *et al*. (2019); Peremarti *et al*. (2010)
BDP	-equal expression of the two genes -avoid gene silencing	further evaluated	high	Ren *et al*. (2019)

[z] TCTU: two-component transcriptional unit; STU: single transcriptional unit; BDP: bidirectional promoter.

酸酶搭配 1 個以上的 gRNA(s)，可能無法實現 Cas 核酸酶與 gRNA(s) 等比例的表達，從而導致標的基因的編輯效率不佳 (Ren *et al*. 2019) (表 1)。

雙向啟動子表現系統 (bidirectional promoter; BDP)

近年來發展的 BDP 系統，是利用單一啟動子同時驅動 Cas 核酸酶與 gRNA(s) 的表現 (圖 1C)，但 Cas 核酸酶與 gRNA(s) 兩者序列為反向 (reverse direction)，與 STU 系統不同的地方在於 Cas 核酸酶與 gRNA(s) 可具有各自獨立的 3′UTR 或終結子 (terminator)，故可具有更好的表現量，進而提供微調的可能性，並維持載體的緊湊性 (Ren *et al*. 2019)。植物天然 BDP (nature BDP; nBDPs) 最早是從玉米的葉綠體染色體中被發現 (Schwarz *et al*. 1981)，隨著基因組定序技術與生物資訊學的發展，植物 BDP 的探勘與研發日益重要。在阿拉伯芥 (Bondino & Valle 2009)、甜瓜 (Wang *et al*. 2008)、辣椒 (Shin *et al*. 2003) 及水稻 (Dhadi *et al*. 2013) 基因組中，皆存在穩定表現的 BDP 系統。Ren *et al*. (2019) 比較水稻內生 BDP 與人工合成 BDP 之基因編輯效率，結果顯示利用基因工程反向表現 2 個 35S 核心啟動子所驅動組合之編輯效率約 10–20%，但前揭 2 個 35S 核心啟動子若再加上增強子 (enhancer) 後，編輯效率可提升至 52%，另使用水稻內生 *OsBiP1* 啟動子驅動之基因編輯效率則可達 86%。

多重 gRNA 表現方式

體內 (*in vivo*) 多重 gRNA 表現載體，可粗略分成 3 種結構 (genetic architectures)：獨立表現卡匣型式、原生 CRISPR-Cas 表現系統之 pre-crRNA 截切，以及轉錄後截切 (post-transcriptionally process) (McCarty *et al*. 2020)。也可利用體外轉錄 (*in vitro* transcription; IVT) 的方式，合成多種小片段 gRNA，再與 Cas 蛋白質組合成核糖蛋白質 (ribonucleoprotein; RNP) 後送入植物細胞，這種無 DNA 片段 (DNA-free) 導入的基因編輯模式，已成功應用的作物包括阿拉伯芥、菸草、萵苣及水稻 (Woo *et al*. 2015)；矮牽牛 (Subburaj *et al*. 2016)；小麥 (Liang *et al*. 2017)；玉米 (Svitashev *et al*. 2016)；大豆 (Kim *et al*. 2017) 以及蘋果 (Malnoy *et al*. 2016)，是目前被認定為極具非基因改造潛力的基因編輯技術。接下來將詳述 6 種 *in vivo* 多重 gRNA 表現之方式。

獨立表現卡匣 (individual expression cassettes)

傳統最常見的表現方式，每個 gRNA 都有各自獨立的啟動子與終結子 (圖 2A)。由於 gRNA 屬於小片段 RNA，一般選擇 Pol III 啟動子 (*U3* 或 *U6* 啟動子)。但載體上重複出現的啟動子序列容易造成啟動子干擾現象 (promoter cross talk effect)，降低整體 gRNA 表現量，或使 gRNA(s) 間表現差異大，重複序列也常發生異源基因的默化現象 (Belele *et al*. 2013)。此外，獨立表現卡匣也限制了載體的選擇。一般而言，農桿菌轉殖載體與病毒載體

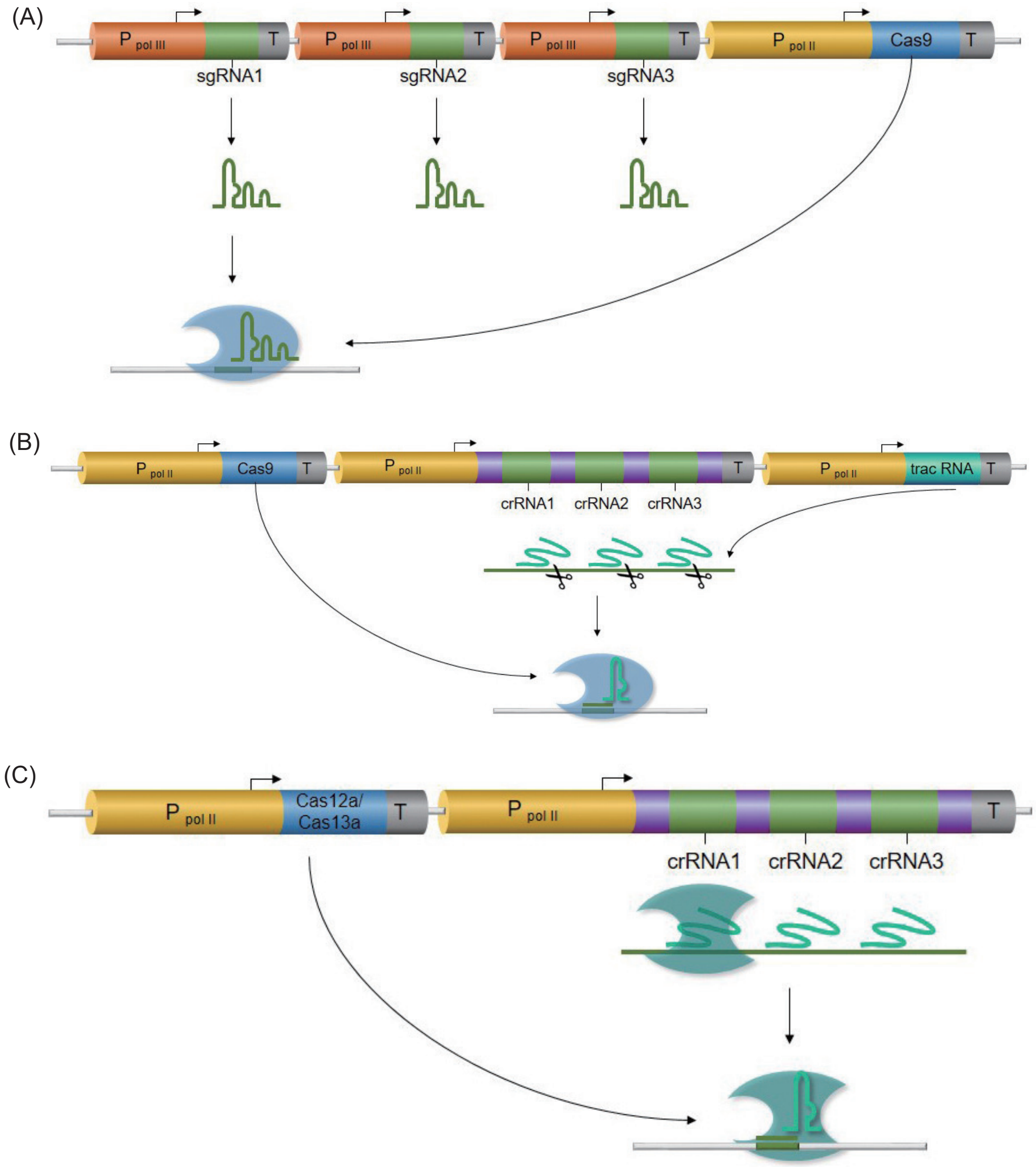


圖 2. 多重 gRNA 表現方式。(A) 獨立表現卡匣：每個 gRNA 有獨立的啟動子與終止子；(B) tracerRNA/RNase III 截切：crRNA 與 tracRNA 結合後，啟動 RNaseIII 進行截切；(C) Cas 12a/Cas 13a/CpfI 截切：不需要 tracrRNA 與 RNase III 即可進行截切；(D) Ribozyme self-cleavage：於 gRNA 的上、下游加上 HH 與 HDV 序列，轉錄產物即可進行自我截切；(E) Csy4 processing：於 gRNA 上游設計 Csy4 辨識序列即可進行截切；(F) tRNA cleaved by RNase：tRNA 初級轉錄產物端點，可被真核生物內生性的 RNase P 與 RNase Z，或細菌中的 RNase E 截切。↱ 表示啟動子。

Fig. 2. Multiplexed gRNA expression approach (McCarty *et al*. 2020). (A) Individual expression cassettes: Each gRNA consists of independent promoter and terminators; (B) tracerRNA/RNase III processing: After the cRNA binds to the tracer RNA, RNase III is activated for truncation; (C) Cas 12a/Cas 13a/CpfI processing: Truncation can be performed without tracrRNA and RNase III; (D) Ribozyme self-cleavage: Self-truncation can be performed by adding HH and HDV sequences upstream and downstream of the gRNA; (E) Csy4 processing: The Csy4 recognition sequence can be designed upstream of the gRNA to truncate; and (F) tRNA cleaved by RNase: The tRNA may be truncated by endogenous RNase P and RNase Z in eucaryotes, or by RNase E in bacteria. ↱ presented the promoters.

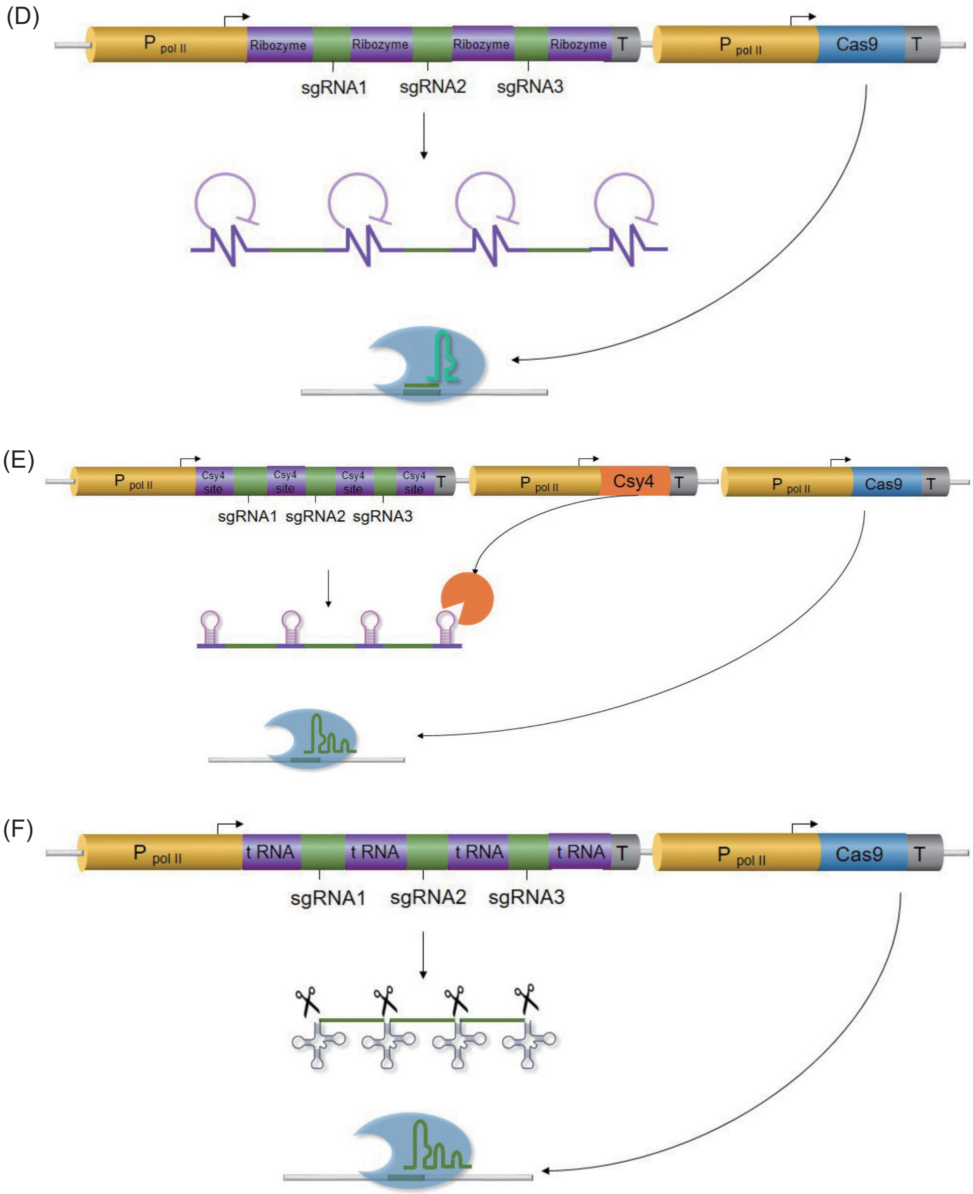


圖 2.　多重 gRNA 表現方式。(A) 獨立表現卡匣：每個 gRNA 有獨立的啟動子與終止子；(B) tracerRNA/RNase III 截切：crRNA 與 tracRNA 結合後，啟動 RNaseIII 進行截切；(C) Cas 12a/Cas 13a/CpfI 截切：不需要 tracrRNA 與 RNase III 即可進行截切；(D) Ribozyme self-cleavage：於 gRNA 的上、下游加上 HH 與 HDV 序列，轉錄產物即可進行自我截切；(E) Csy4 processing：於 gRNA 上游設計 Csy4 辨識序列即可進行截切；(F) tRNA cleaved by RNase：tRNA 初級轉錄產物端點，可被真核生物內生性的 RNase P 與 RNase Z，或細菌中的 RNase E 截切。↱ 表示啟動子。(續)

Fig. 2.　Multiplexed gRNA expression approach (McCarty *et al*. 2020). (A) Individual expression cassettes: Each gRNA consists of independent promoter and terminators; (B) tracerRNA/RNase III processing: After the cRNA binds to the tracer RNA, RNase III is activated for truncation; (C) Cas 12a/Cas 13a/CpfI processing: Truncation can be performed without tracrRNA and RNase III; (D) Ribozyme self-cleavage: Self-truncation can be performed by adding HH and HDV sequences upstream and downstream of the gRNA; (E) Csy4 processing: The Csy4 recognition sequence can be designed upstream of the gRNA to truncate; and (F) tRNA cleaved by RNase: The tRNA may be truncated by endogenous RNase P and RNase Z in eucaryotes, or by RNase E in bacteria. ↱ presented the promoters. (contimued)

相比，較適合長片段基因的轉殖。若將獨立表現卡匣分別放在不同的載體，進行共轉殖，則常有轉殖效率低下的問題 (Peremarti *et al*. 2010)，且通常單一農桿菌株只能攜帶單一種質體，前揭獨立表現卡匣策略就需要多種帶有不同表現質體農桿菌進行共感染，常不利於多基因編輯卡匣的同時導入 (Minkenberg *et al*. 2017)。所以如何在單一載體上成功表現多個 gRNA 就顯得相當重要。

原生/內生表現方式

(1) tracerRNA/RNase III processing：其屬於原生 CRISPR-Cas 表現系統之 pre-crRNA 截切方式，根據第二類第二型 (Class II Type II) 系統之 pre-crRNA 截切原理，在 crRNA 的上下游設計與 tracrRNA 互補的重複序列，當初級 RNA 產物與 tracrRNA 結合後，啟動內生的 RNase III 酵素進行 RNA 截切，產生多個 gRNA 片段 (Deltcheva *et al*. 2011; Mikami *et al*. 2017) (圖 2 B)。

(2) Cas 12a/Cas 13a/CpfI processing：屬於原生 CRISPR-Cas 表現系統之 pre-crRNA 截切方式，根據第二類第五型 (Class II Type V) 系統之 pre-crRNA 截切原理設計。Cas 12a/Cas 13a (或稱 Cpf1) 核酸酶約 1,300 個胺基酸，與 Cas9 不同的是 Cpf1 不需要 tracrRNA 也不需要額外的 RNase III 即可獨力完成 pre-crRNA 截切，能與 Cpf1 結合之 gRNA 僅需要 42 nt，其中 19 nt 為 5 端莖環結構 (stem-loop structure)，3 端 23 nt 為目標辨識序列 (Zetsche *et al*. 2015)，正確構型之 pre-crRNA 可截切產生多個 crRNA 片 段 (Fonfara *et al*. 2016; Ding *et al*. 2018) (圖 2C)，此策略已成功應用於水稻多重基因編輯 (Wang *et al*. 2017)。

轉錄後截切方式

(1) Ribozyme self-cleavage：該構築方法使用轉錄後截切原理，由於核糖核酸酵素 (ribozyme) 廣泛存在於各物種中，本身是一段 RNA 但具有自我截切 (self-cleavage) 功能，在 gRNA 的上、下游分別加入錘頭狀核糖核酸酵素 (hammerhead ribozyme; HH) 序列與 D 型肝炎病毒核糖核酸酵素 (Hepatitis Delta Virus ribozyme; HDV) 序列，轉錄產物即可進行自我截切，可精確產生 gRNA，該方法也擴展應用於體內多重 gRNAs 的表達 (Lee *et al*. 2016; Xu *et al*. 2016a; He *et al*. 2017) (圖 2D)。

(2) Csy4 processing：該構築方法使用轉錄後截切原理，Csy4 (Cas6f) 屬於第一類第三型 (Class I Type III) CRISPR-Cas 系統的核酸酶，可以辨識初級 RNA 上 28 nt 之莖環結構 (stem-loop structure)，並截切下游 20 nt 位置 (Haurwitz *et al*. 2010)，於 gRNA 上游設計 Csy4 辨識序列即可進行截切，產生多重 gRNAs (圖 2E)，此方法已成功應用於細菌、酵母菌及哺乳動物 (Nissim *et al*. 2014; Ferreira *et al*. 2018; Kurata *et al*. 2018)。在番茄、小麥、大麥原生質體 (protoplast) 及苜蓿皆具有相當好的多重基因編輯效果 (Čermák *et al*. 2017)。但由於 Csy4 截切系統需要額外表達外源的 Csy4 蛋白質，但該蛋白質表現量過高時，易產生細胞毒性，導致取得候選植株的難度提高 (Nissim *et al*. 2014)。

(3) tRNA cleaved by RNase：該構築方法使用轉錄後截切原理，內生性 tRNA 截切是目前廣泛使用於植物、動物甚至是微生物的一種策略，具有以下幾個特性：tRNA 之初級轉錄產物之端點，可被真核生物內生性的 RNase P 與 RNase Z，或細菌中的 RNase E 截切。RNase P 與 RNase Z 截切位置和 pre-tRNA 序列無關，具有受體臂 (acceptor stem)、D 臂 (D-loop arm) 及核糖體辨識區 TψC 臂 (TψC-loop arm) 二級結構即可，tRNA 轉錄常以 polycistronic 型式出現，且 tRNA 基因序列具有 Pol III 啟動子強化元件，內生性的 tRNA 截切系統可處理大量的初級轉錄產物 (Xie *et al*. 2015) (圖 2F)。基於以上特點內生性 tRNA 截切系統適合做為跨物種的多重 gRNA 表現平台，與核糖核酸酵素自我截切策略相比，tRNA 截切策略加入的序列較短，tRNA 選擇多元可避免特定序列重複出現造成的默化現象，

其設計原理是在多個 gRNA 序列間插入 77 bp 長度的 pre-tRNA 序列，此技術已在人類胚胎細胞、甜橙、水稻以及油菜中被廣泛應用於多基因編輯 (Xie *et al*. 2015; Tang *et al*. 2016; Dong *et al*. 2017; Oliva *et al*. 2019; Zhang *et al*. 2021; Huang *et al*. 2022)

多重基因編輯於作物精準育種之應用

多重基因編輯的研究已於水稻、番茄、小麥、馬鈴薯及油菜等作物上，在其產量、營養成分、抗病性、抗逆境能力及對除草劑耐受性等方面，有精準且成功的研究成果 (表 2)，茲介紹如下：

作物產量之精準育種── 水稻為例

水稻產量構成要素主要取決於有效穗數、每穗粒數、稔實率及千粒重，是複雜且重要的作物性狀，並受多種數量性狀基因座 (quantitative trait loci; QTLs) 共同調控。已有 21 個調節水稻產量相關性狀的基因被選殖出來，如粒型 (*Grain Size 3*; *GS3*)、粒寬 (*Grain Width*; *GW2* 與 *GW5*)、千粒種 (*Thousand-Grain Weight 6*; *TGW6*)、莖桿直立 (*Dense and erect panicle 1*; *DEP1*) 及每穗粒數 (*Grain number1a*; *Gn1a*) 等基因缺失導致粒重的增加，故為粒重之負調控因子。往昔研究顯示將 *OsGW2*、*OsGW5*、*OsTGW6* 及 *OsGn1a* 等基因，利用 TCTU 系統與獨立表現卡匣的 gRNA 的表現方式進行多重基因編輯，其粒長、粒寬及千粒種分別增加 24.21–25.32%、19.79–20.46% 及 27.13–29.84% (Xu *et al*. 2016b)。此外，非洲稻具抗病、抗蟲及乾旱耐受性，但因其產量低、易倒伏及落粒等缺點，因此常被忽視。Lacchini *et al*. (2020) 利用 TCTU 系統與 tRNA 截切原理，編輯非洲稻 *OsGn1a*、*OsGs3* 及 *OsGW2* 等基因，獲得 *gn1a gs3 gw2* 突變體，其種子重量顯著增加了 24%。上述例子說明多重基因編輯策略確可有效運用在多基因共同調控產量數量性狀之精準育種。

表 **2.** 作物多重基因編輯的案例。

Table 2. The case of multiple gene editing in plants.

Plant species	Target genes	Method[z]	Application	References
rice	*OsGW2*, *OsGW5*, and *OsTGW6*	A	yield	Xu *et al*. (2016b)
rice	*OsGW2*, *OsGW5*, and *OsTGW6*	B	yield	Lacchini *et al*. (2020)
tomato	*SGR1*, *LCY-E*, *Blc*, *LCY-B1*, *LCY-B2*	A	quality	Li *et al*. (2018b)
tomato	*GABA-TP1*, *GABA-TP2*, *GABA-TP3*, *CAT9*, *SSADH*	A	quality	Li *et al*. (2018a)
potato	*St16DOX*	B	quality	Nakayasu *et al*. (2018)
rice	*GBSS*	B	quality	Ma *et al*. (2015)
tomato	*SlTOM1a/d*, *SlTOM1b*, *SlTOM1c*	A	biotic stress	Ishikawa *et al*. (2022)
rice	*SWEET11*, *SWEET13*, *SWEET14*	B	biotic stress	Oliva *et al*. (2019)
sweet orange	*LOB1*	B	biotic stress	Huang *et al*. (2022)
rapeseed	*BnQCR8*	D	biotic stress	Zhang *et al*. (2021)
rapeseed	*BnaA.WRKY70.a*, *BnaA.WRKY70.b* *BnaC. WRKY70.b*	A	biotic stress	Sun *et al*. (2018)
tomato	*SlHyPRP1*	A	abiotic stress	Tran *et al*. (2021)
rice	*SR*	B	abiotic stress	Butt *et al*. (2019)
rapeseed	*EPSPS*	C	herbicide stress	Wang *et al*. (2021)
rice	*ALS*	A	herbicide stress	Sun *et al*. (2016)

[z] Multiple gRNAs expression strategies: A: two-component transcriptional unit (TCTU) + individual expression cassettes; B: TCTU + tRNA cleaved by RNase; C: TCTU + Csy4 processing; D: single transcriptional unit (STU) + tRNA cleaved by RNase.

營養與機能成分之精準育種── 以番茄之茄紅素與 γ-胺基丁酸 (γ-aminobutyric acid; GABA)、馬鈴薯之固醇類配醣生物鹼 (steroidal glycoalkaloids; SGA) 及水稻之糯性為例

茄紅素是一種 C40 類胡蘿蔔素，在果實成熟過程中經由類胡蘿蔔素合成路徑所產生，主要依賴異戊烯二磷酸酯 (*isopentenyl diphosphate*; *IPP*) 與其異構體二甲烯丙烯基焦磷酸 (*dimethylallyl disphosphate*; *DMAPP*) 2 種前驅物，*IPP* 與 *DMAPP* 進行縮合反應生成香葉基焦磷酸合酶 (*geranylgeranyl pyrophosphate synthase*; *GGPP*)。然後，2 分子的 *GGPP* 被八氫番茄紅素合成酶 1 (*phytoene synthase 1*, *PSY1*) 催化形成 1 分子無色的 15-順式八氫番茄紅素 (*15-cis-phytoene*)。再經由八氫番茄紅素去氫酶 (*phytoene desaturase*; *PDS*) 的作用產生 ζ-carotene 與其異構物，再經過去飽和作用，將 ζ-carotene 轉換成茄紅素，藉由茄紅素 β-環化酶 1 (*lycopene β-cyclase 1*; *LCY-B1* 與 *LCY-B2*) 與 β-番茄紅素環化酶 (*beta-lycopene cyclase*; *Blc*) 將茄紅素環化生成 β-胡蘿蔔素，另一種途徑是茄紅素 ε-環化酶 (*lycopene ε-cyclase*; *LCY-E*) 與 β-番茄紅素環化酶 (Blc) 將茄紅素環化生成 α-胡蘿蔔素。最終，這些物質可降解為葉黃素、玉米黃質及其他類胡蘿蔔素。Li *et al*. (2018b) 利用雙向系統與獨立表現卡匣的 gRNA 表現方式，採取雙向策略，一是將番茄果實中維持綠色基因 (*Stay-green 1*; *SGR1*) 之轉錄因子進行編輯，使 *SGR1* 無法與 *PSY1* 相互作用，進而促進茄紅素的合成。二是將催化番茄紅素環化的基因，例如 *LCY-E*、*LCY-B1* 與 *LCY-B2*、*LCY-E* 以及 *Blc* 等上述 5 個基因進行編輯，防止茄紅素環化為 α-胡蘿蔔素與 β-胡蘿蔔素，進而提高 5.1 倍茄紅素的積累。

GABA 為大腦的傳導物質，可舒緩情緒與調節血壓 (Inoue *et al*. 2003; Nakamura *et al*. 2009)，可作為現代人工作壓力大最佳的營養補充劑。GABA 主要合成途徑為穀胺酸脫酸酶 (glutamic acid decarboxylase; GAD) 將 L-glutamate 穀胺酸脫羧基而產生 GABA。並進一步被 GABA 轉胺酶 (GABA transaminase; GABA-T) 催化轉變為琥珀酸半醛 (succinic semialdehyde; SSA)，最後則是經由琥珀酸半醛脫氫酶 (SSA dehydrogenase; SSADH) 將琥珀酸半醛催化轉變為琥珀酸 (succinate) 並進入檸檬酸循環 (TCA cycle)。另一方面研究發現另一種陽離子氨基酸轉運蛋白 (cationic amino acid transporter; CAT9) 會將液泡中的 GABA 轉運至粒線體進行分解代謝，影響 GABA 之表現量。因此 GABA-T、SSADHLi、CAT9 等酵素在番茄 GABA 主要合成與代謝途徑扮演關鍵因子。其中 GABA-T 有 2 種異構體：包括丙酮酸依賴性 (*pyruvate-dependent GABA-T*; *GABA-TP*) 與 α- 酮戊二酸依賴性 (*α-ketoglutarate-dependent GABA-T*; *GABA-TK*)。只有 *GABA-TP* 基因被證實存在於番茄植物中，而 *GABA-TP* 可再細分成 *GABA-TP1*、*GABA-TP2* 及 *GABA-TP3* 等 3 個基因家族。因此 Li *et al*. (2018a) 將與 *GABA-TP1*、*GABA-TP2*、*GABA-TP3*、*SSADH* 及 *CAT9*，利用 TCTU 系統與獨立表現卡匣的 gRNA 表現方式進行編輯，結果顯示編輯系與野生型番茄相比，葉片 GABA 的含量可增加 19 倍，果實 GABA 亦增加 4 倍。日本於 2021 年 9 月已通過高 GABA 番茄上市 (Gramazio *et al*. 2020)。

馬鈴薯 (*Solanum tuberosum*) 是一種主要的糧食作物，但大部分組織都積累了 SGA，故具苦味與毒性，因此，降低塊莖中的 SGA 含量，是馬鈴薯品質育種的重要目標。Nakayasu *et al*. (2018) 將合成 SGA 生物鹼之 *St16DOX* 基因，設計了 9 個 gRNA，命名為 T1–T9，利用 TCTU 系統與 tRNA 截切原理形成 4 種多位點基因編輯之組合分別為 T1/T2、T3/T4、T5/T6 及 T7/T8/T9，結果顯示所有編輯系之 SGA 含量皆低於對照品種，其中又以 T1/T2_#6 與 T7/T8/T9_#4 兩個獨立品系幾乎不含 SGA。因此馬鈴薯經基因編輯後，毛狀根中無法表現 *St16DOX* 基因與積累 SGA，進而抑制毒性產生。

水稻 *OsWaxy* 基因是編碼顆粒澱粉合成酶 (*granule-bound starch synthase*; *GBSS*) 合成直鏈澱粉主要基因，Ma *et al*. (2015) 設計 3 個 gRNA，利用 TCTU 系統與 tRNA 截切原理，進行水稻 *OsWaxy* 基因編輯，結果顯示產生 1

個或 2 個位點突變的 T_0 植株種子，其直鏈澱粉含量從 14.6% 下降到 2.6%，米質近似於糯米品種，進而改變稻米品質。

提高作物抗病性之精準育種── 以番茄褐色皺果病、水稻白葉枯病及油菜菌核病為例

番茄褐色皺果病毒 (Tomato brown rugose fruit virus; ToBRFV) 為 Tobamovirus 病毒屬，因其可突破番茄抗病基因 *Tm2* 而受到國際檢疫之高度重視。目前已知植物體內的跨膜蛋白質 *TOBAMOVIRUS MULTIPLICATION1* (*TOM1*) 參與病毒複製，而番茄中具有 5 個 *TOM1* 同源基因，分別為 *SlTOM1a*、*SlTOM1b*、*SlTOM1c*、*SlTOM1d* 及 *SlTOM1e*，由於 *SlTOM1e* 表現量極低，而 *SlTOM1a* 與 *SlTOM1d* 同源性高，Ishikawa *et al*. (2022) 以 TCTU 表現系統配合獨立卡匣之 gRNA 表現方式，設計 3 種 sgRNA，分別針對 *SlTOM1a/d*、*SlTOM1b* 及 *SlTOM1c* 基因進行編輯，所得三重突變體 *Sltom1bcd*、*Sltom1abd* 及 *Sltom1abc* 於接種後，仍可偵測到 ToBRFV，而 *Sltom1acd* 接種 21 d 後才偵測到低水平的 ToBRFV，所有 *TOM1* 同源基因皆突變之 *Sltom1abcd* 於接種後 21 d 完全無病徵，且偵測不到 ToBRFV。

水稻白葉枯病 (bacterial blight) 之病原為 *Xanthomona oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) 分泌多種類轉錄活化因子 (transcription-activator-like effectors; TALEs)，如 PthXo1、PthXo2A、PthXo2B、PthXo2C、PthXo3、TalC、TalF 及 AvrXa7 等，可結合水稻蔗糖轉運蛋白質基因 *SWEET* 基因家族 *SWEET11*、*SWEET13* 及 *SWEET14* 啟動子上的調節因子結合區 (effector binding element; EBE)，啟動相關基因表現而改變糖的代謝，加速病原菌侵入的繁殖力，例如 Oliva *et al*. (2019) 利用 TCTU 表現系統與 tRNA 截切原理，同時編輯水稻 6 個 EBEs 序列，取得 5 個 EBEs 位點同時發生編輯之突變株，對於不同地區之 Xoo 具有廣效型的抗性。相同的策略也應用於柑橘細菌性潰瘍病 (citrus bacterial canker) 抗性提升，柑橘細菌性潰瘍病由 *X. citri* subsp. *citri* (Xcc) 所引起，Xcc 分泌類轉錄活化因子 PthA4，PthA4 進入細胞核後會與植物的潰瘍感病基因 (*LATERAL ORGAN BOUNDARIES 1*; *LOB1*) 啟動子之 EBE 結合，進而活化 *LOB1* 的表現。由於甜橙 (*Citrus sinensis*) 來自柚子 (*C. maxima*) 與柑橘 (*C. reticulata*) 的種間雜交，大多數品種基因組都具有 2 個來源的等位基因，對 Xcc 不具抗性，例如 Huang *et al*. (2022) 針對第 I 型與第 II 型 *CsLOB1* 基因啟動子 EBE 序列設計 3 個 gRNA，利用 TCTU 表現系統與 tRNA 截切原理進行甜橙多重基因編輯，取得 *CsLOB1* 之同型結合編輯系，該編輯係具有良好的 Xcc 抗性。

油菜 (*Brassica napus* L.) 是世界重要的油料作物，常受菌核病 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 與灰黴病 (*Botrytis cinerea*) 影響產量，已知道菌核病的小型分泌致病相關蛋白質 (small secreted virulence-related protein; SsSSVP) 為致病因子，可與油菜粒線體之細胞色素 b-c1 複合體保守次單元 (cytochrome b-c1 complex conserved subunit) BnQCR8 結合，使 BnQCR8 的分布由粒線體轉移到細胞質，進而影響植物呼吸作用進行；而油菜為異源四倍體，其中，歐洲油菜品種 ‘westra’ 具有 8 個 *BnQCR8* 同源基因，利用 STU 表現系統配合 tRNA 截切原理進行 *BnQCR8* 多重基因編輯，降低 BnQCR8 與 SsSSVP 的結合能力，其中 7 個 *BnQCR8* 基因同時被編輯植株，具有最高的抗病性，編輯系抗病能力隨著 *BnQCR8* 基因編輯數量的增加而遞增，且不影響產量 (Zhang *et al*. 2021)。*WRKY* 轉錄因子與多種植物抗病反應，Sun *et al*. (2018) 應用 TCTU 表現系統配合獨立卡匣之 gRNA 表現原理，設計多重基因編輯載體，針對 4 個油菜 *BnWRKY70* 同源基因 *BnaA.WRKY70.a*、*BnaA.WRKY70.b*、*BnaC.WRKY70.a* 及 *BnaC.WRKY70.b* 進行編輯，其中 *BnaA.WRKY70.a*、*BnaA.WRKY70.b* 及 *BnaC.WRKY70.b* 同時被編輯後，油菜編輯系對核盤菌屬 (*Sclerotinia*) 具有良好的抗病性。

提升作物抗逆境能力之精準育種── 以番茄之富含脯氨酸的雜合蛋白 (HyPRPhybrid proline rich proteins; HyPRPs) 與水稻絲氨酸/精氨酸豐富蛋白質 (serine/arginine-rich proteins; SR) 為例

作物生長的環境逆境，包括乾旱、鹽害、溫度及重金屬等。對於作物生存面臨重大挑戰。其中乾旱與鹽害是對全球種植的最重要威脅之一 (Van Zelm *et al*. 2020)，由於鹽分導

致氣孔關閉、水分吸收減少及最終降低植物的光合效率。已知植物富含脯氨酸的雜合蛋白質 (HyPRPs) 為植物細胞壁結構蛋白質，其表現是受到多種環境逆境等影響，例如病原菌感染、傷口、乾旱及鹽分 (Goodwin *et al*. 1996; Otte & Barz 2000)。番茄 *SlHyPRP1* 已被證明是多重逆境反應的負調節因子，當番茄 *SlHyPRP1* 基因表現受到抑制時，會導致 SOD 與過氧化氫酶等抗氧化酶的表現量增強，從而提高耐受性 (Li *et al*. 2016)。Tran *et al*. (2021) 將 *SlHyPRP1* 基因上 N 端結構域 (PRD) 與保守的八半胱氨酸基序 (8CM) C 端結構利用 TCTU 系統配合獨立表現卡匣 gRNA 表現原理，設計多重基因編輯載體，取得 8 種不同組合之編輯系，並於不同鹽濃度下進行發芽期試驗，結果顯示於 150 mM NaCl 濃度下，以 PRD 結構域被移除之 *PR1v1* 與 *PR3* 編輯系耐鹽性表現最好。

SR 蛋白質在真核生物中參與 pre-mRNA 剪接，經過一連串的加工後，形成不同的成熟 RNA，進一步轉譯成不同蛋白，因此是基因表現調控的重要機制。水稻有 22 個 SR 蛋白質成員，是現有已知物種中最多的，可分為 6 個亞科。其中 3 個亞科 (SR、RSZ 及 SC) 在真核生物中是保守的，而其餘的 (SCL、RS2Z 及 RS) 是植物專一所有。在植物中，只有阿拉伯芥 SR 蛋白質被廣泛研究，大多數 SR 突變體對鹽、ABA、乾旱及重金屬等非生物逆境具有高度敏感，因此利用 TCTU 系統配合 tRNA 截切原理編輯水稻 SR 基因家族，所產生的各種突變體，將有助於探討 SR 蛋白質在植物生長、發育及逆境下的分子作用 (Butt *et al*. 2019)。

提高對除草劑耐受性之精準育種 — 以 *enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase* (*EPSPS*) 與乙醯乳酸合酶 (*acetolactate synthase*; *ALS*) 基因為例

有效的控制雜草可以維持油菜產量與品質。Wang *et al*. (2021) 將受除草劑影響的 *EPSPS* 基因，利用 TCTU 系統配合 Cys4 截切原理，將野生型 (WT) *BnaC04EPSPS* 基因片段上 2 個 sgEPSPS1t and sgEPSPS2t 的編輯位點，透過 homology direct repair (HDR) 同源基因置換的方式，將目標位點置換成 TIPS 或 LFGAAGMCRL 氨基酸殘基，所得之基因編輯系生長至 12 d 大的幼苗時，以 800× 稀釋的草甘膦溶液 (Roundup, Monsanto, Creve Coeur, MO, USA) 進行噴灑處理，結果發現 10 d 後全部 TIPS 與 LFGAAGMCRL 突變植株正常生長，沒有損傷症狀，而野生型植株則生長矮小，葉片枯萎。由此可知，學者透過此次基因編輯的策略，確可顯著地提升植株對嘉磷賽除草劑的耐受性。另，ALS 是一種合成 lencine、isoleucine 及 valine 等胺基酸支鏈合成的關鍵酵素，而雙草醚 (bispyribac-sodium) 除草劑會抑制此酵素活性，進而導致植株死亡。若利用 TCTU 系統與獨立表現卡匣 gRNA 的表現方式，透過 HDR 同源基因置換將 *ALS* 基因位於 W548 的序列，由色氨酸 (Trp) 變成白氨酸 (Leu)，同時將另外一個位於 S627 的序列位點，由絲氨酸 (Ser) 變成異白氨酸 (Ilu)，結果發現所獲得的編輯系，可在 100 mM 的雙草醚除草劑處理下存活。因此，學者透過此次基因編輯的策略，確可顯著地提升植株對雙草醚除草劑的耐受性 (Sun *et al*. 2016)。

結論

綜合上述，多重基因編輯已廣泛用植物基因調節與基因功能探勘，透過多重基因編輯同時編輯多個共同調控目標性狀之基因，已成功運用於水稻、小麥、玉米、番茄及馬鈴薯等主要糧作其相關產量、抗病、營養成分及環境逆境等重要性狀之改良。全球氣候變遷過程，農業生產不穩定、糧食生產受到影響且生物多樣性逐漸消失，作物正面臨生物性與非生物性逆境的環境威脅，農業生產面臨許多考驗。因此，多重基因編輯技術在農作物改良與植物基因的功能探勘更顯重要，本文章回顧多重基因編輯之載體、多 gRNA 表現方式及其特性與優缺點等，並舉例說明成功的案例，冀能提供相關資訊，針對欲改良作物的特性與育種目的，挑選適合之編輯策略，更能夠精準地掌握特定性狀，縮短育種時間與減少人力，並發展出更多更具潛力的作物品系，使各種作物能夠在不斷變化的氣候變遷中適應生存，確保未來全球的糧食安全。

引用文獻

Belele, C. L., L. Sidorenko, M. Stam, R. Bader, M. A. Arteaga-Vazquez, and V. L. Chandler. 2013. Specific tandem repeats are sufficient for paramutation-induced trans-generational silencing. PLoS Genet. 9:e1003773. doi:10.1371/journal.pgen.1003773

Bondino, H. G. and E. M. Valle. 2009. A small intergenic region drives exclusive tissue-specific expression of the adjacent genes in Arabidopsis thaliana. BMC Mol. Biol. 10:95. doi:10.1186/1471-2199-10-95

Butt, H., A. Piatek, L. Li, A. S. N. Reddy, and M. M. Mahfouz. 2019. Multiplex CRISPR mutagenesis of the serine/arginine-rich (SR) gene family in rice. Genes 10:596. doi:10.3390/genes10080596

Cao, H. X., W. Wang, H. T. T. Le, and G. T. H. Vu. 2016. The power of CRISPR-Cas9-induced genome editing to peed up plant breeding. Intl. J. Genomics 2016:5078796. doi:10.1155/2016/5078796

Čermák, T., S. J. Curtin, J. Gil-Humanes, R. Čegan, T. J. Y. Kono, E. Konečná, J. J. Belanto, C. G. Starker, J. W. Mathre, R. L. Greenstein, and D. F. Voytas. 2017. A multipurpose toolkit to enable advanced genome engineering in plants. Plant Cell 29:1196–1217. doi:10.1105/tpc.16.00922

Chen, K., Y. Wang, R. Zhang, H. Zhang, and C. Gao. 2019. CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. Annu. Rev. Plant Biol. 70:667–697. doi:10.1146/annurev-arplant-050718-100049

Deltcheva, E., K. Chylinski, C. M. Sharma, K. Gonzales, Y. Chao, Z. A. Pirzada, M. R. Eckert, J. Vogel, and E. Charpentier. 2011. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. Nature 471:602–607. doi:10.1038/nature09886

Dhadi, S. R., A. Deshpande, K. Driscoll, and W. Ramakrishna. 2013. Major *cis*-regulatory elements for rice bidirectional promoter activity reside in the 5'-untranslated regions. Gene 526:400–410. doi:10.1016/j.gene.2013.05.060

Ding, D., K. Chen, Y. Chen, H. Li, and K. Xie. 2018. Engineering introns to express RNA guides for Cas9- and Cpf1-mediated multiplex genome editing. Mol. Plant 11:542–552. doi:10.1016/j.molp.2018.02.005

Dong, F., K. Xie, Y. Chen, Y. Yang, and Y. Mao. 2017. Polycistronic tRNA and CRISPR guide-RNA enables highly efficient multiplexed genome engineering in human cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 482:889–895. doi:10.1016/j.bbrc.2016.11.129

Enfissi, E. M. A., M. Drapal, L. Perez-Fons, M. Nogueira, H. M. Berry, J. Almeida, and P. D. Fraser. 2021. New plant breeding techniques and their regulatory implications: An opportunity to advance metabolomics approaches. J. Plant Physiol. 258–259:153378. doi:10.1016/j.jplph.2021.153378

Fang, Y., J. Jiang, X. Hou, J. Guo, X. Li, D. Zhao, and X. Xie. 2022. Plant protein-coding gene families: Their origin and evolution. Front. Plant Sci. 13:995746. doi:10.3389/fpls.2022.995746

Ferreira, R., C. Skrekas, J. Nielsen, and F. David. 2018. Multiplexed CRISPR/Cas9 genome editing and gene regulation using Csy4 in *Saccharomyces cerevisiae*. ACS Synth. Biol. 7:10–15. doi:10.1021/acssynbio.7b00259

Fonfara, I., H. Richter, M. Bratovič, A. Le Rhun, and E. Charpentier. 2016. The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA. Nature 532:517–521. doi:10.1038/nature17945

Goodwin, W., J. A. Pallas, and G. I. Jenkins. 1996. Transcripts of a gene encoding a putative cell wall-plasma membrane linker protein are specifically cold-induced in *Brassica napus*. Plant Mol. Biol. 31:771–781.

Gramazio, P., M. Takayama, and H. Ezura. 2020. Challenges and prospects of new plant breeding techniques for GABA improvement in crops: Tomato as an example. Front. Plant Sci. 11:577980. doi:10.3389/FPLS.2020.577980

Haurwitz, R. E., M. Jinek, B. Wiedenheft, K. Zhou, and J. A. Doudna. 2010. Sequence- and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease. Science 329:1355–1358. doi:10.1126/science.1192272

He, Y., T. Zhang, N. Yang, M. Xu, L. Yan, L. Wang, R. Wang, and Y. Zhao. 2017. Self-cleaving ribozymes enable the production of guide RNAs from unlimited choices of promoters for CRISPR/Cas9 mediated genome editing. J. Genet. Genomics 44:469–472. doi:10.1016/j.jgg.2017.08.003

Ho, B. X., S. J. H. Loh, W. K. Chan, and B. S. Soh. 2018. *In vivo* genome editing as a therapeutic approach. Intl. J. Mol. Sci. 19:2721. doi:10.3390/ijms19092721

Huang, X., Y. Wang, and N. Wang. 2022. Highly efficient generation of canker-resistant sweet orange enabled by an improved CRISPR/Cas9 system. Front. Plant Sci. 12:769907. doi:10.3389/fpls.2021.769907

Inoue, K., T. Shirai, H. Ochiai, M. Kasao, K. Hayakawa, M. Kimura, and H. Sansawa. 2003. Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing γ-aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. Eur. J. Clin. Nutr. 57:490–495. doi:10.1038/sj.ejcn.1601555

Ishikawa, M., T. Yoshida, M. Matsuyama, Y. Kouzai, A.

Kano, and K. Ishibashi. 2022. Tomato brown rugose fruit virus resistance generated by quadruple knockout of homologs of *TOBAMOVIRUS MULTIPLICATION*$_1$ in tomato. Plant Physiol. 189:679–686. doi:10.1093/plphys/kiac103

Kim, H., S. T. Kim, J. Ryu, B. C. Kang, J. S. Kim, and S. G. Kim. 2017. CRISPR/Cpf1-mediated DNA-free plant genome editing. Nat. Commun. 8:14406. doi:10.1038/ncomms14406

Kurata, M., N. K. Wolf, W. S. Lahr, M. T. Weg, M. G. Kluesner, S. Lee, K. Hui, M. Shiraiwa, B. R. Webber, and B. S. Moriarity. 2018. Highly multiplexed genome engineering using CRISPR/Cas9 gRNA arrays. PLoS ONE 13:e0198714. doi:10.1371/journal.pone.0198714

Lacchini, E., E. Kiegle, M. Castellani, H. Adam, S. Jouannic, V. Gregis, and M. M. Kater. 2020. CRISPR-mediated accelerated domestication of African rice landraces. PLoS ONE 15:e0229782. doi:10.1371/journal.pone.0229782

Lee, R. T. H., A. S. M. Ng, and P. W. Ingham. 2016. Ribozyme mediated gRNA generation for *in vitro* and *in vivo* CRISPR/Cas9 mutagenesis. PLoS ONE 11:e0166020. doi:10.1371/journal.pone.0166020

Li, J., B. Ouyang, T. Wang, Z. Luo, C. Yang, H. Li, W. Sima, J. Zhang, and Z. Ye. 2016. HyPRP1 gene suppressed by multiple stresses plays a negative role in abiotic stress tolerance in tomato. Front. Plant Sci. 7:1–14. doi:10.3389/fpls.2016.00967

Li, R., R. Li, X. Li, D. Fu, B. Zhu, H. Tian, Y. Luo, and H. Zhu. 2018a. Multiplexed CRISPR/Cas9-mediated metabolic engineering of γ-aminobutyric acid levels in *Solanum lycopersicum*. Plant Biotechnol. J. 16:415–427. doi:10.1111/pbi.12781

Li, X., Y. Wang, S. Chen, H. Tian, D. Fu, B. Zhu, Y. Luo, and H. Zhu. 2018b. Lycopene is enriched in tomato fruit by CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing. Front. Plant Sci. 9:559. doi:10.3389/fpls.2018.00559

Lian, J., M. HamediRad, S. Hu, and H. Zhao. 2017. Combinatorial metabolic engineering using an orthogonal tri-functional CRISPR system. Nat. Commun. 8:1688. doi:10.1038/s41467-017-01695-x

Liang, Z., K. Chen, T. Li, Y. Zhang, Y. Wang, Q. Zhao, J. Liu, H. Zhang, C. Liu, Y. Ran, and C. Gao. 2017. Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. Nat. Commun. 8:14261. doi:10.1038/ncomms14261

Lowder, L., A. Malzahn, and Y. Qi. 2016. Rapid evolution of manifold CRISPR systems for plant genome editing. Front. Plant Sci. 7:1683. doi:10.3389/fpls.2016.01683

Lusser, M., C. Parisi, D. Plan, and E. Rodriguez-Cerezo. 2011. New Plant Breeding Techniques: State-of-the-Art and Prospects for Commercial Development. JRC Sci. Tech. Rep. Publications Office of the European Union. Luxembourg. 218 pp. doi:10.2791/54761

Ma, X., Q. Zhang, Q. Zhu, W. Liu, Y. Chen, R. Qiu, B. Wang, Z. Yang, H. Li, Y. Lin, Y. Xie, R. Shen, S. Chen, Z. Wang, Y. Chen, J. Guo, L. Chen, X. Zhao, Z. Dong, and Y. G. Liu. 2015. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. Mol. Plant 8:1274–1284. doi:10.1016/j.molp.2015.04.007

Malnoy, M., R. Viola, M. H. Jung, O. J. Koo, S. Kim, J. S. Kim, R. Velasco, and C. N. Kanchiswamy. 2016. DNA-free genetically edited grapevine and apple protoplast using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins. Front. Plant Sci. 7:1904. doi:10.3389/fpls.2016.01904

McCarty, N. S., A. E. Graham, L. Studená, and R. Ledesma-Amaro. 2020. Multiplexed CRISPR technologies for gene editing and transcriptional regulation. Nat. Commun. 11:1281. doi:10.1038/s41467-020-15053-x

Mikami, M., S. Toki, and M. Endo. 2015. Parameters affecting frequency of CRISPR/Cas9 mediated targeted mutagenesis in rice. Plant Cell Rep. 34:1807–1815. doi:10.1007/s00299-015-1826-5

Mikami, M., S. Toki, and M. Endo. 2017. In planta processing of the SpCas9–gRNA complex. Plant Cell Physiol. 58:1857–1867. doi:10.1093/pcp/pcx154

Minkenberg, B., M. Wheatley, and Y. Yang. 2017. CRISPR/Cas9-enabled multiplex genome editing and its application. Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. 149:111–132. doi:10.1016/bs.pmbts.2017.05.003

Nakamura, H., T. Takishima, T. Kometani, and H. Yokogoshi. 2009. Psychological stress-reducing effect of chocolate enriched with γ-aminobutyric acid (GABA) in humans: Assessment of stress using heart rate variability and salivary chromogranin A. Intl. J. Food Sci. Nutr. 60:106–113. doi:10.1080/09637480802558508

Nakayasu, M., R. Akiyama, H. J. Lee, K. Osakabe, Y. Osakabe, B. Watanabe, Y. Sugimoto, N. Umemoto, K. Saito, T. Muranaka, and M. Mizutani. 2018. Generation of α-solanine-free hairy roots of potato by CRISPR/Cas9 mediated genome editing of the *St16DOX* gene. Plant Physiol Biochem. 131:70–77. doi:10.1016/j.plaphy.2018.04.026

Nissim, L., S. D. Perli, A. Fridkin, P. Perez-Pinera, and T. K. Lu. 2014. Multiplexed and programmable regulation of gene networks with an integrated RNA and CRISPR/Cas toolkit in human cells. Mol. Cell

54:698–710. doi:10.1016/j.molcel.2014.04.022

Oliva, R., C. Ji, G. Atienza-Grande, J. C. Huguet-Tapia, A. Perez-Quintero, T. Li, J. S. Eom, C. Li, H. Nguyen, B. Liu, F. Auguy, C. Sciallano, V. T. Luu, G. S. Dossa, S. Cunnac, S. M. Schmidt, I. H. Slamet-Loedin, C. Vera Cruz, B. Szurek, W. B. Frommer, F. F. White, and B. Yang. 2019. Broad-spectrum resistance to bacterial blight in rice using genome editing. Nat. Biotechnol. 37:1344–1350. doi:10.1038/s41587-019-0267-z

Otte, O and W. Barz. 2000. Characterization and oxidative *in vitro* cross-linking of an extensin-like protein and a proline-rich protein purified from chickpea cell walls. Phytochemistry 53:1–5. doi:10.1016/s0031-9422(99)00463-x

Peremarti, A., R. M. Twyman, S. Gómez-Galera, S. Naqvi, G. Farré, M. Sabalza, B. Miralpeix, S. Dashevskaya, D. Yuan, K. Ramessar, P. Christou, C. Zhu, L. Bassie, and T. Capell. 2010. Promoter diversity in multigene transformation. Plant Mol. Biol. 73:363–378. doi:10.1007/s11103-010-9628-1

Qiao, X., Q. Li, H. Yin, K. Qi, L. Li, R. Wang, S. Zhang, and A. H. Paterson. 2019. Gene duplication and evolution in recurring polyploidization–diploidization cycles in plants. Genome Biol. 20:38. doi:10.1186/s13059-019-1650-2

Ren, Q., Z. Zhong, Y. Wang, Q. You, Q. Li, M. Yuan, Y. He, C. Qi, X. Tang, X. Zheng, T. Zhang, Y. Qi, and Y. Zhang. 2019. Bidirectional promoter-based CRISPR-Cas9 systems for plant genome editing. Front. Plant Sci. 10:1173. doi:10.3389/fpls.2019.01173

Schwarz, Z., S. O. Jolly, A. A. Steinmetz, and L. Bogorad. 1981. Overlapping divergent genes in the maize chloroplast chromosome and *in vitro* transcription of the gene for $tRNA^{His}$. Proc. Natl. Acad. Sci. 78:3423–3427. doi:10.1073/pnas.78.6.3423

Shin, R., M. J. Kim, and K. H. Paek. 2003. The *CaTin1* (*Capsicum annuum* TMV-induced Clone 1) and *CaTin1-2* genes are linked head-to-head and share a bidirectional promoter. Plant Cell Physiol. 44:549–554. doi:10.1093/pcp/pcg069

Subburaj, S., S. J. Chung, C. Lee, S. M. Ryu, D. H. Kim, J. S. Kim, S. Bae, and G. J. Lee. 2016. Site-directed mutagenesis in *Petunia* × *hybrida* protoplast system using direct delivery of purified recombinant Cas9 ribonucleoproteins. Plant Cell Rep. 35:1535–1544. doi:10.1007/s00299-016-1937-7

Sun, Q., L. Lin, D. Liu, D. Wu, Y. Fang, J. Wu, and Y. Wang. 2018. CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing of the *BnWRKY11* and *BnWRKY70* genes in *Brassica napus* L. Intl. J. Mol. Sci. 19:2716. doi:10.3390/ijms19092716

Sun, Y., X. Zhang, C. Wu, Y. He, Y. Ma, H. Hou, X. Guo, W. Du, Y. Zhao, and L. Xia. 2016. Engineering herbicide-resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of acetolactate synthase. Mol. Plant 9:628–631. doi:10.1016/j.molp.2016.01.001

Svitashev, S., C. Schwartz, B. Lenderts, J. K. Young, and A. Mark Cigan. 2016. Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. Nat. Commun. 7:13274. doi:10.1038/ncomms13274

Tang, X., X. Zheng, Y. Qi, D. Zhang, Y. Cheng, A. Tang, D. F. Voytas, and Y. Zhang. 2016. A single transcript CRISPR-Cas9 system for efficient genome editing in plants. Mol. Plant 9:1088–1091. doi:10.1016/j.molp.2016.05.001

Tran, M. T., D. T. H. Doan, J. Kim, Y. J. Song, Y. W. Sung, S. Das, E. J. Kim, G. H. Son, S. H. Kim, T. Van Vu, and J. Y. Kim. 2021. CRISPR/Cas9-based precise excision of SlHyPRP1 domain(s) to obtain salt stress-tolerant tomato. Plant Cell Rep. 40:999–1011. doi:10.1007/s00299-020-02622-z

Van Zelm, E., Y. Zhang, and C. Testerink. 2020. Salt tolerance mechanisms of plants. Annu. Rev. Plant Biol. 71:403–433. doi:10.1146/annurev-arplant-050718-100005

Wang, C., D. Ding, R. Yan, X. Yu, W. Li, and M. Li. 2008. A novel bi-directional promoter cloned from melon and its activity in cucumber and tobacco. J. Plant Biol. 51:108–115. doi:10.1007/BF03030719

Wang, M., Y. Mao, Y. Lu, X. Tao, and J. K. Zhu. 2017. Multiplex gene editing in rice using the CRISPR-Cpf1 system. Mol. Plant 10:1011–1013. doi:10.1016/j.molp.2017.03.001

Wang, M., Y. Mao, Y. Lu, Z. Wang, X. Tao, and J. K. Zhu. 2018. Multiplex gene editing in rice with simplified CRISPR-Cpf1 and CRISPR-Cas9 systems. J. Integr. Plant Biol. 60:626–631. doi:10.1111/jipb.12667

Wang, Z., L. Wan, Q. Xin, X. Zhang, Y. Song, P. Wang, D. Hong, Z. Fan, and G. Yang. 2021. Optimizing glyphosate tolerance in rapeseed by CRISPR/Cas9-based geminiviral donor DNA replicon system with Csy4-based single-guide RNA processing. J. Exp. Bot. 72:4796–4808. doi:10.1093/jxb/erab167

Woo, J. W., J. Kim, S. I. Kwon, C. Corvalán, S. W. Cho, H. Kim, S. G. Kim, S. T. Kim, S. Choe, and J. S. Kim. 2015. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. Nat. Biotechnol. 33:1162–1164. doi:10.1038/nbt.3389

Xie, K., B. Minkenberg, and Y. Yang. 2015. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. Proc.

Natl. Acad. Sci. 112:3570–3575. doi:10.1073/pnas.1420294112

Xu, L., L. Zhao, Y. Gao, J. Xu, and R. Han. 2016a. Empower multiplex cell and tissue-specific CRISPR-mediated gene manipulation with self-cleaving ribozymes and tRNA. Nucleic Acids Res. 45:e28. doi:10.1093/nar/gkw1048

Xu, R., R. Qin, H. Li, J. Li, J. Yang, and P. Wei. 2019. Enhanced genome editing in rice using single transcript unit CRISPR-*Lb*Cpf1 systems. Plant Biotechnol. J. 17:553–555. doi:10.1111/pbi.13028

Xu, R., Y. Yang, R. Qin, H. Li, C. Qiu, L. Li, P. Wei, and J. Yang. 2016b. Rapid improvement of grain weight via highly efficient CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing in rice. J. Genet. Genomics 43:529–532. doi:10.1016/j.jgg.2016.07.003

Yoshioka, S., W. Fujii, T. Ogawa, K. Sugiura, and K. Naito. 2016. Development of a mono-promoter-driven CRISPR/Cas9 system in mammalian cells. Sci. Rep. 5:18341. doi:10.1038/srep18341

Zafar, S. A., S. S. E. A. Zaidi, Y. Gaba, S. L. Singla-Pareek, O. P. Dhankher, X. Li, S. Mansoor, and A. Pareek. 2020. Engineering abiotic stress tolerance via CRISPR/Cas-mediated genome editing. J. Exp. Bot. 71:470–479. doi:10.1093/jxb/erz476

Zetsche, B., J. S. Gootenberg, O. O. Abudayyeh, I. M. Slaymaker, K. S. Makarova, P. Essletzbichler, S. E. Volz, J. Joung, J. van der Oost, A. Regev, E. V. Koonin, and F. Zhang. 2015. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. Cell 163:759–771. doi:10.1016/j.cell.2015.09.038

Zhang, X., J. Cheng, Y. Lin, Y. Fu, J. Xie, B. Li, X. Bian, Y. Feng, W. Liang, Q. Tang, H. Zhang, X. Liu, Y. Zhang, C. Liu, and D. Jiang. 2021. Editing homologous copies of an essential gene affords crop resistance against two cosmopolitan necrotrophic pathogens. Plant Biotechnol. J. 19:2349–2361. doi:10.1111/pbi.13667

Zimny, T. 2022. New genomic techniques and their European Union reform. Potential policy changes and their implications. Front. Bioeng. Biotechnol. 10:1019081. doi:10.3389/fbioe.2022.1019081

Application of Multiple Gene Editing in Plant Precision Breeding

Yi-Wen Wang[1,**], Han-Wei Chen[2,**], Shuen-Chi You[2], Jau-Yueh Wang[2], and Da-Gin Lin[3,*]

Abstract

Wang, Y. W., H. W. Chen, S. C. You, J. Y. Wang, and D. G. Lin. 2023. Application of multiple gene editing in plant precision breeding. J. Taiwan Agric. Res. 72(3):181–196.

Multiple gene editing is one of the highly efficient tools for novel precision breeding. Since two or more different DNA sites in the genome can be edited simultaneously, it is suitable for the exploration of important traits regulated by quantitative trait genes or homologous gene families. The systems of multiplex gene editing can be roughly divided into three modes: zinc finger nucleases (ZFNs), transcription activator-like effector nucleases (TALENs), and CRISPR/Cas. Among them, CRISPR/Cas has become the mainstream due to its simple operation, high editing efficiency, and low cost. Therefore, this article mainly discusses the advanced multiple gene editing system that was developed based on CRISPR/Cas. Furthermore, the subject will focus on the editing purpose, vector construction expression system, multiple gRNA expression methods, and successful examples in rice, wheat, corn, rape, tomato, potato and other food and economically important crops. We hope that this article can serve as a reference for researchers conducting related research.

Key words: Multiple gene editing, Precision breeding, Quantitative trait genes, Homologous genes.

Received: January 6, 2023; Accepted: May 7, 2023.
[*] Corresponding author, e-mail: dagin@tari.gov.tw
[**] These authors contributed equally to this work.
[1] Contract Assistant Research Fellow, Crop Genetic Resources and Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[2] Assistant Research Fellows, Crop Genetic Resources and Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[3] Contract Associate Research Fellow, Crop Genetic Resources and Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 72(3):197–218 (2023)
DOI:10.6156/JTAR.202309_72(3).0002

Research Article

Taxonomic Review of the Genus *Phola* Weise, 1890 (Coleoptera: Chrysomelidae: Chrysomelinae)

Chi-Feng Lee[1,*] and Michael F. Geiser[2]

Abstract

Lee, C. F. and M. F. Geiser. 2023. Taxonomic review of the genus *Phola* Weise, 1890 (Coleoptera: Chrysomelidae: Chrysomelinae). J. Taiwan Agric. Res. 72(3):197–218.

The taxonomic status of *Phola octodecimguttata* (Fabricius, 1775) and its synonyms are re-evaluated. *Phyllophila sedecimpustulata* Stål, 1857 as a junior synonym of *Phola octodecimguttata* is supported by examining their type specimens and genitalic characters in a large number of specimen. In addition, *Chalcolampra dipa* Maulik, 1926 **n. syn.** is herein synonymized with *Phola octodecimguttata*. *Phola decempustulata* (Baly, 1864) **n. comb.**, transferred from *Chalcolampra*, is examined and redescribed. New data on the biology of *P. octodecimguttata* are provided. Its association with the coastal plant *Vitex rotundifolia* helps explain its occurrence on many small islands.

Key words: Leaf beetle, Taxonomy, Lamiaceae, *Vitex*, Island biogeography.

INTRODUCTION

The genus *Phola* was established by Weise (1890) for *P. keyserlingi* Weise, 1890 for a single species, *P. keyserlingi* Weise, 1890. It was synonymized with *Chalcolampra* Blanchard, 1835 by Daccordi (1994), and this synonymy was followed by Kippenberg (2010) and some Japanese researchers (e.g., Takahashi 2012; Kamezawa 2015; Shigetoh 2019, 2020a; Shigetoh *et al*. 2019). However, the type species of *Phola* and *Chalcolampra* both occur in and were treated in a detailed revision of the Australian Chrysomelinae genera by Reid (2006). Based on morphological and biological differences, he regarded them both as distinct genera. Most subsequent taxonomists agreed with his opinion (Yang *et al*. 2015; Matsumura *et al*. 2018; Suenaga *et al*. 2018; Shigetoh 2020b, 2020c). In the present study, we therefore decided to also follow Reid (2006) by treating *Phola* and *Chalcolampra* as distinct genera.

Phola octodecimguttata (Fabricius, 1775) seems to be a widespread species with variable color patterns. It is not surprised to such a species having many synonyms. Several synonyms have been proposed by various authors. *Chalcolampra* (*Phyllophila*) *cybele* was described from Hong Kong (China) by Stål (1860) and was synonymized by Gressitt & Kimoto (1963). *Chalcolampra viticis* was described from Jiangxi (China) by Fairmaire (1888) and synonymized by Chen (1934). *Phola keyserlingi* was described from Sichuan (China) by Weise (1890) and synonymized by Jacoby (1896). In addition, *Phyllophila sedecimpustulata* was described from Pulo Penang (Malaysia) by Stål (1857). It was synonymized by Baly (1867), but Kimoto & Gressitt (1981) still regarded it as valid species based on larger size and its distinct color pattern, and Mohamedsaid (1993, 1997) followed their opinions. None of the acts, however, provided strong morphological or biological evidence from a

Received: July 7, 2023; Accepted: July 26, 2023.
* Corresponding author, email: chifeng@tari.gov.tw
1 Contract Research Fellow, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
2 Curator in Charge of Insects: Coleoptera, Department of Life Sciences, Natural History Museum, London, UK.

wide geographical sampling. Consequently, some synonymizations were not fully acknowledged. In addition, there could be more potential synonyms of *P. octodecimguttata* or true *Phola* species remained hidden in *Chalcolampra*. This study re-evaluate the taxonomic status of each specific names by examining genitalic characters of both sexes collected from different localities.

In addition to *Phola octodecimguttata* (Fabricius, 1775), two species originally described as *Chalcolampra* can be attributed to *Phola*: these are *C. decempustulata* Baly, 1864 from Becan Island (Maluku, Indonesia) and *C. dipa Maulik*, 1926 from Andaman Island (India). These two are currently treated as valid species. The aim of our present study is to re-evaluate the synonymy of *P. octodecimguttata* and its relatives, including *Chalcolampra dipa* and *C. decempustulata* based on a large material collected throughout their geographic range, and to give more detailed re-descriptions of all the valid species of the genus. Fresh material collected in Taiwan also allows us to add some notes on the biology of *P. octodecimguttata*.

MATERIALS AND METHODS

To study the biology of *P. octodecimguttata* in detail, the beetles from Taiwan were collected from the field and kept for captive breeding together with their host plant *Vitex rotundifolia* for a complete generation. Females laid eggs inside the plastic bags when they were collected on May 7, 2008 (Fig. 5A). Hatched larvae were placed in small glass containers (diameter 142 mm × height 50 mm) with cuttings from host plants. When mature larvae began searching for pupation sites, they were transferred to smaller plastic containers (diameter 90 mm × height 57 mm) filled with moist soil, the amount about 80% of container volume.

The present study is based on morphological examination of over 400 dry-mounted adult specimens. For delimiting variability of diagnostic characters, at least one pair from each locality was examined. Length was measured from the anterior margin of the eye to the elytral apex, and width at the greatest width of the elytra. Type specimens available for study and voucher specimens are deposited at The Natural History Museum, London, UK (BMNH); Naturhistoriska Riksmuseet, Stockholm, Sweden (NHRS); the Laboratory for Systematic Entomology, Hokkaido University, Sapporo, Japan (SEHU), and the Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan (TARI); Zoological Institute, Russian Academy of Science, St. Petersburg, Russia (ZIN).

Exact label data are cited for all type specimens of described species; a double slash (//) divides the data on different labels and a single slash (/) divides the data in different rows. Other comments and remarks are in square brackets: [p] – preceding data are printed, [h] – preceding data are handwritten, [w] – white label, and [r] – red label.

RESULTS

Genus Phola Weise, 1890

Phola Weise, 1890:482 (type species: *Phola keyserlingi* Weise, 1890, by monotypy, a junior synonym of *Chrysomela octodecimguttata* Fabricius, 1775).

Phyllophila Stål, 1857:59 (nec Guenée, 1852) (type species: *Phyllophila sedecimpustulata* Stål, 1857).

Remarks. The genus *Phyllophila* Stål, 1857 was synonymized with *Chalcolampra* Blandchard, 1853 by Baly (1867) who regarded *P. sedecimpustulata* Stål, 1857 as a junior synonym of *C. octodecimguttata* (Fabricius, 1775). However, *Phyllophila* has been preoccupied by a moth genus described by Guenée (1852). Chen (1934) noticed that *Phyllophila* Stål was a junior homonym, also a distinct genus from *Chalcolampra*. He confirmed the validity of *Phola* Weise, 1890 and used the name to replace *Phyllophila* Stål, 1857.

A detailed generic diagnosis was provided by Reid (2006). The genus is similar to *Chalcolampra* but differs in possessing larger eyes

and almost impunctate venters and epipleura. Biological characteristics are based on the type species, *Phola octodecimguttata* (see below).

Included species. *Phola octodecimguttata* (Fabricius, 1775) and *P. decempustulata* (Baly, 1864), **comb. nov.**

Even though Reid (2006) only mentioned a single described species in Australia (*P. octodecimguttata*), Australian Faunal Directory (Australian Biological Resources Study (ABRS) 2020) lists four additional species: *P. decemmaculata* (Lea, 1903), *P. delicatula* (Lea, 1916), *P. quadrifasciata* (Lea, 1916), *P. tenuis* (Lea, 1916) and *P. vitticollis* (Lea, 1915). We are not able to find a published source formally transferring these species to *Phola*, nor are we able to confirm their generic placement. We are not treating these species in the present study but acknowledge the possibility that they may indeed be members of *Phola*.

Distribution. Oriental region, extending into Japan, Australia, Solomon Islands, and Papua New Guinea.

Phola octodecimguttata (Fabricius, 1775)

Chrysomela octodecimguttata Fabricius, 1775:100 (Nova Hollandia = Australia); Fabricius 1781:123 (catalogue); Gmelin 1790:1676 (catalogue); Fabricius 1792:322 (catalogue); Fabricius 1801:439 (catalogue).

Phyllocharis octodecimguttata: Boisduval 1835:575.

Chalcolampra octodecimguttata: Baly 1855:186 (re-examination of the type specimens); Baly 1867:281 (Malaysia, Singapore, Sri Lanka); Harold 1874:3467 (catalogue); Jacoby 1884:27 (Indonesia: Sumatra); Jacoby 1896:254 (India: Kanara; Malaysia: Perak; China); Weise 1916:199 (catalogue); Maulik 1926:87 (redescription: India, Sri Lanka, Myanmar); Winkler 1930:1298 (catalogue: China); Wang & Yang 2006:66 (China: Gansu); Takahashi 2012:280 (Japan: Honshu: Tottori Prefecture; Kyushu: Kagoshima Prefecture; Shikoku: Kochi Prefecture); Kamezawa 2015:52 (Japan: Bôsô-hantô Peninsula); Shigetoh & Yoshitake 2018:35 (Japan: Yoro-jima Island); Shigetoh 2019:22 (Japan: Tonaki-jima Island); Shigetoh *et al.* 2019:146 (Japan: Ou-jima Island); Shigetoh 2020a:43 (Japan: Tsuken-jima Island).

Phola octodecimguttata: Chen 1934:81 (redescription, China: Jiangsu, Jiangxi, Zhejiang; Taiwan; Philippines: Luzon; Vietnam); Chûjô 1935a:81 (Japan: Ishigaki, Iriomote, and Okinawa Islands); Chûjô 1935b:211 (distribution); Chûjô 1958 (redescription; Taiwan, including Pescadores (= Penghu Islands 澎湖群島) and Botel-Tobago (= Lanyu Island 蘭嶼); Chen 1936:90 (catalogue); Nakane & Kimoto 1961a:75 (Japan: Nakanoshima Island and Takara-jima Island); Nakane & Kimoto 1961b:17 (Japan: Ishigaki Island); Chûjô & Kimoto 1961:154 (list; Japan: Okinawa, Tokara Islands); Gressitt & Kimoto 1963:372 (China: Anhui, Guandong, Guanxi, Fujian, Shanxi, Hainan); Kimoto 1964a:285 (catalogue; Japan: Kyushu); Kimoto 1964b:487 (Taiwan: Takao = Kaohsiung); Kimoto 1966:25 (Taiwan: Takao = Kaohsiung); Kimoto & Gressitt 1966:517 (Japan: Amami-Ôshima); Kimoto 1969:22 (Taiwan: Taoyuan: Kuanyin (觀音); Lanyu Island); Azuma & Kimoto 1978:125 (Japan: Yonaguni Island); Azuma & Kimoto 1981 (Japan: Hateruma Island, Tarama Island, Yakabi Island, Iheya Island); Kimoto & Gressitt 1981:390 (catalogue); Wang *et al.* 1998:51 (China: Fujian: Wuyishan 武夷山); Yang *et al.* 2015:4 (China: Hebei, Hubei, Hunan, Guizhou); Matsumura *et al.* 2018:13 (Japan: Iheya-jima Island); Suenaga *et al.* 2018:107 (Japan: Tokunoshima Island); Yamazaki *et al.* 2019:33 (Japan: Iheyajima Island); Shigetoh 2020b:48 (Japan: Ou-jima Island); Shigetoh 2020c:151 (Japan: Yoron-jima Island).

Phyllophila sedecimpustulata Stål, 1857: 59 (Malaysia: Pulo Penang). Synonymized by Baly (1867).

Phola sedecimpustulata: Kimoto & Gressitt 1981:390 (valid species; Thailand, Laos, Vietnam).

Chalcolampra sedecimpustulata: Mohamedsaid 1993:6 (East Malaysia: Sabah); Mo-

hamedsaid 1997:122 (Peninsular Malaysia: Johor, Kedah, Melaka, Negeri Sembilan, Pahang, Selangor, Terengganu).

Chalcolampra (*Phyllophila*) *cybele* Stål, 1860:464 (China: Hong Kong). Synonymized by Gressitt & Kimoto (1963)

Chalcolampra viticis Fairmaire, 1888:39 (China: Jiangxi); Chen 1938:1 (list). Synonymized by Chen (1934)

Phola keyserlingi Weise, 1890:482 (China: Sichuan). Synonymized by Jacoby (1896)

Chalcolampra dipa Maulik, 1926:89 (India: Andaman Islands). **syn. nov.**

Types. *Chrysomela octodecimguttata* (Figs. 1A–D). Two syntypes in the Banks collection at the BMNH, among them one bearing a transverse square label: "*Chrys: 18guttata* [h] / Fab. Entom. p. [p] 100. n. sp. [h, w, with black border]; the other one damaged seriously, with one circle label: "97 / 89 [h, w]". Here the intact specimen (Fig. 1A) is designated as the lectotype and the other specimen with lost right elytron (Fig. 1B) as the paralectotype.

Phyllophila sedecimpustulata (Figs. 1E–H). Holotype ♀ (NHRS, fixed by monotypy): "Pulo / Penang [h, w] // Westerm [p, w] // *Phyllophila* / *16pustulata* / St. [h, w] // Type. [p, w] // NHRS-ALJB / 000000798 [p, w]".

Chalcolampra (Phyllophila) cybele (Figs. 1I–L). Holotype ♀ (NHRS, fixed by monotypy): "Hong / Kong [h, w] // Stål [h, w] // Type. [p, w] // Typus [p, r, with black border] // *Cybele* / Stål. [h, w] // NHRS-ALJB / 000000797 [p, w]".

Phola keyserlingi. (Figs. 2A–D). Holotype ♀ (ZIN, fixed by monotypy): "Sze-tchuan / 1885 / G. Patanin. [p, w] // 22/VIII [h, underside of the same label] // unicum [h, w, probably mening returning material] // Phola / Keyserlingi Ws. [h, w]". This type was supposed to be deposited at the Museum für Naturkunde der Humboldt-Universität, Berlin, German (ZMB) (Gressitt & Kimoto 1963) probably because it was described by Weise. However, Bernd Jäger (curator at the ZMB) indicated that the type should be at the ZIN since it was collected by Potanin during the Russian expedition to Mongolia and China (personal communication, June 16, 2023). Alexey Moseyko (curator at the ZIN) confirmed its existence (personal communication, July 14, 2023).

Chalcolampra dipa (Figs. 2E–H). Holotype ♂ (BMNH, fixed by monotypy): "Andaman / Islands [p, w] // Roepstorff [p, w] // Type [p, w, circle label with red border] // *Chalcolampra* / *dipa* Maulik [h] / Det. S. Maulik [p] / Type 1923 [h, w] // 47461 [h, w]".

Specimens examined. AUSTRALIA. New South Wales: 1♂(BMNH); Northern Territory: 2♂, 2♀ (BMNH), Darwin, 1915-381, leg. G. F. Hill; 1 ex. (BMNH), same locality, 1909, coll. G. Bryang; 1♂ (BMNH), same but with "1921-274"; Queensland: 1 ex. (BMNH), Bundaberg, 1904, coll. R. C. L. Perkins; 1 ex. (BMNH), Cairns, XI.1909, leg. G. E. Bryant; 2 exs. (BMNH), same but "II.1909"; 4♂, 4♀ (SEHU), Lone Pine, 8.I.1973, leg. Y. Komiya; 148 exs. (BMNH), Thursday Island, 14.I.1939; 2 exs. (BMNH), Townsville, 11.II.1903, leg. F. P. Dodd; 2 exs. (BMNH), same locality, 1921-274, leg. G. F. Hill; 2♂, 2♀ (BMNH), same but with "1922-230"; **BRUNEI.** 1 ex. (BMNH), Seira, at light, V.–VII.1978, leg. P. H. Hammond & J. E. Marshall; **CHINA.** 1♂ (BMNH), "N.China"; Fujian: 1♀ (BMNH), Chongan (崇安), 9.II.1969, leg. S. Q. Jiang; 1♀ (BMNH), same locality, 10.VI.1960, leg. Y. R. Zhang; 9 exs. (BMNH), Foochow (= Fuzhou, 福州), 1935, leg. M. S. Yang; 1 ex. (BMNH), same but "1936"; 1 ex. (BMNH), same but "10.VI.1936"; 1♂ (BMNH), Jianyang (建陽), 19.VI.1960, leg. S. Q. Jiang; Gansu: 1♀ (BMNH), Wenxian (文县), 27.VI.1998, leg. X. K. Yang; Hong Kong: 2♂, 1♀ (BMNH), coll. Baly; Yunnan: 1 ex. (TARI), Mocheng (磨整), 19.III.2018, leg. Y. T. Wang; 4 exs. (TARI), Mohan (磨憨), 19.III.2018, leg. Y. T. Wang; 1 ex. (TARI), same locality, 1.IV.2018, leg. Y. T. Wang; 1 ex. (TARI), same locality, 13.V.2018, leg. C. C. Chen; 1 ex. (TARI), Nabang (那邦), 27.V.2016, leg. Y. T. Wang; 1 ex. (TARI), same but with "17.VI.2017"; 1 ex. (TARI), same but with "20.VI.2017"; 1 ex. (TARI), same but with "30.VI.2017"; **INDIA.** Andaman Islands: 1 ex. (BMNH). Tamil Nadu: 1♂ (BMNH), Nilgiri

Hills, 1894-89, leg. G. F. Hampson; **INDONESIA.** Java: 1♂ (BMNH), 60-15, coll. Horsfield; Kalimantan: 1 ex. (BMNH), Borneo, S. East, German Mission, Fry Coll.; Sulawesi: 1♀ (BMNH), Sulawesi Utara, Dumoga-Bone N. P., Fog 13, BMNH Plot A, 230 m, 11.VII.1985, Project Wallace ; Sumatra: 3 exs. (TARI), Sanggul, IV.2004, leg. S. Jakl; **JAPAN.** Amami Islands: Amami-Ohshima: 3♂, 3♀ (SEHU), Katetsu, Setouchi-chô, 22.VII.1962, leg. Y. Komiya; 1♀ (SEHU), Sude, Setouchi-chô, 13.VII.1962, leg. Y. Komiya; Okinawa Islands: Iriomote Island: 4♂, 9♀ (TARI), V.1932, leg. S. Hirayama; 2♀ (SEHU), Ohara, 23.V.1977, leg. J. Okuma; 1♂ (SEHU), same but with "7.VI.1977"; 1♀ (SEHU), Toyohara, 25.V.1977, leg. J. Okuma; Ishigaki Island: 1♂, 2♀ (TARI), 22.IV.1930, leg. R. Takahashi 2♂, 6♀ (TARI), V.1933, leg. S. Hirayama; 1♂, 2♀ (SEHU), Hirakubo, 1.IV.1976, leg. K. Kusama; 2♀ (SEHU), Tomino, 5.V.1976, leg. M. Yagi; Okinawa Island: 2 exs. (TARI), Mawashi, 12.VI.1932, leg. H. Yashiro; 2♂, 4♀ (TARI), Naha, Loo-Choo (= Okinawa Island), 4.V.1931, leg. S. Asahina; 1♂ (TARI), Syuri, 11.IV.1937, leg. A. Morisita; **MALAYSIA**. Johor: 1♂, 1♀ (BMNH), Mt. Ophir, 23.VIII.1905; 1 ex. (BMNH), Nr. Jitra, catchment area, 8.IV.1928, ex F.M.S. Museum; 1 ex. (BMNH), West Coast, Langkawi Is., 22.IV.1928, ex F.M.S. Museum; Kelantan: 1♀ (BMNH), Tebing Tinggi, VII.1920, Coll. V. Knight, ex F.M.S. Museum; Kuala Lumpur: 1♀ (BMNH), 12.XI.1934; 1♀ (BMNH), 2.III.1919; Melaka: 1♂, 1♀ (BMNH); 2 exs. (BMNH), coll. H. Clark: 1 ex. (BMNH), coll. Baly; 1♀ (BMNH), 1901-37, coll. H. N. Ridley; 1 ex. (BMNH), C.B.H. Hunt. 1908-194; Penang: 1♂ (BMNH), coll. Pascoe; Perak: 1♀ (BMNH), 1905-313, coll. Sharp; 1♂ (BMNH), 1905-100, leg. Doherty; 4 exs. (BMNH), Fry Coll; 1 ex. (BMNH), Perak Museum, Taiping, ex F.M.S. Museum; 1 ex. (BMNH), Kuala Kangsar, VIII.1907, R.H. Coll., ex F.M.S. Museum; Sabah: 1♀ (SEHU), Poring, 9.IV.1979, leg. N. Nishikawa; Sarawak: 2 exs. (BMNH), Bidi, 1.II.1909, leg. C. J. Brooks; 1♂ (BMNH), 17th ml., kls Rd., 17.VIII.1963, coll. S. Kueh; Selangor: 1♂ (SEHU), Templer Park, 23.XII.1983, leg. M. Takakuwa; **MYANMAR**. Bago Region: 1♂ (BMNH), Tharrawaddy; Chin State: 1 ex. (TARI), Kanpetlet, 24.V.2017, leg. Y. T. Wang; 1 ex. (TARI), Mindat, 22.V.2017, leg. Y. T. Wang; 1♀ (BMNH), North Chin Hills, 1894-4; Mandalay Region: 4 exs. (TARI), Mt. Popa, 25–26.V.2017, leg. Y. T. Wang; **PAPUA NEW GUINEA**. Jiwaka: 1♂, 1♀ (BMNH), Jimi Valley, 20.VII.1972, leg. B. Gray; **PHILIPPINES**. 1 ex. (BMNH), "Phil.Isla"; **SINGAPORE**. 1 ex. (BMNH), 1933-227, coll. Saunders; **SOLOMON ISLANDS**. Guadalcanal: 1♀ (BMNH), Kukum, 25.V.1963, leg. P. J. M. Greenslade; 1♀ (BMNH), same but "10.I.1963"; 1♀ (BMNH), same but with "2.I.1965"; 8♂, 2♀ (BMNH), same but with "11.II.1965"; Shortland: 1♀ (BMNH), Alu (= Shortland), III.1884; **SRI LANKA**. 1♂, 2♀ (BMNH), Ceylon (= Sri Lanka); 1 ex. (BMNH), Balangoda, 1776 ft., 13–16.III.1882, coll. G. Lewis; 1 ex. (BMNH), Dikoya, 6.XII.1881–16.I.1882, coll. G. Lewis; 1 ex. (BMNH), Kandy, 1919-147, coll. G. Bryant; 1 ex. (BMNH), same but "VI.1908"; 1♂, 2♀ (BMNH), Peradeniya, 26.VIII.1914, leg. A. Rutherford; **TAIWAN**. Hualien: 1♀ (TARI), Karenko (= Hualien, 花蓮), 21.IV.1910, leg. I. Nitobe; Kaohsiung: 25 exs. (TARI), Baolai (寶來), 17.IV.2016, leg. U. Ong; 1♂ (TARI), Rokki (= Liuguei, 六龜), 2.V.1907, leg. I. Nitobe; 1♀ (TARI), same locality, 23.X.1921, leg. M. Yoshino; 1♂ (SEHU), 26.IV.1978, leg. Y. Komiya; 2♀ (SEHU), Liuguei, Kenshan, 20.III.1978, leg. Y. Ito; 1♀ (TARI), Rono (= Laonung, 荖濃), 3.V.1907, leg. I. Nitobe; Matsu: 3 exs. (TARI), Beigan Island (北竿島), 11.V.2023, leg. C. F. Lee; New Taipei City: 5 exs. (TARI), Qianshuiwan (淺水灣), 7.V.2007, H. J. Chen; 9 exs. (TARI), same but with "25.V.2007"; 3 exs. (TARI), Linshanpi (麟山鼻), 15.IX.2007, leg. S. F. Yu; 1♀ (TARI), Sinten (= Hsindien, 新店), VII.1929, leg. Y. Miwa; Penghu: 1♀ (TARI), Bokoto (= Penghu Island, 澎湖本島), 25.IV.1920, leg. T. Shirake; 4 exs. (TARI), Donji Island (東吉嶼), 19.V.2023, leg. Y. C. Liao; 1♀ (TARI), Hookotoo (= Penghu), V.1930, leg. S. Minowa; Kinmen: Kinmen Island (金門島): 8 exs. (TARI),

Jinsha (金沙), 13.IV.2022, leg. C. F. Lee; Lieyu Island (烈嶼): 13 exs. (TARI), Xihu (西湖), 2.V.2015, leg. Y. J. Chang; 6 exs. (TARI), same but with "Chilinshan (麒麟山)"; Pingtung: 3♂, 1♀ (TARI), Heito (= Pingtung, 屏東), V.–VI.1931, leg. Y. Miwa; 1 ex. (TARI), Junaishan (女乃山), 28.XI.2020, leg. Y. T. Chung; 2♂, 2♀ (BMNH), Kenting (墾丁), 2.VIII.2008, at light, leg. H. Mendel, M. V. L. Barclay; 1 ex. (TARI), same locality, 26.VII.2016, leg. Y. T. Chung; 2♂ (TARI), Koshun (= Hengchun, 恆春), 25.IV.–25.V.1918, leg. J. Sonan; 1♂ (TARI), Gueishan (龜山), 3.IV.2023, leg. J. C. Chen; 7 exs. (TARI), Lilungshan (里龍山), 7.VIII.2015, leg. Y. T. Chung; 7♂, 2♀ (TARI), Liuqiu Island (琉球嶼), 22–23.III.1982, leg. K. C. Chou & C. C. Pan; 1♂ (TARI), Rikiriki (= Lilisheh, 力里社), 22.III.1924, leg. N. Takeda; 1♂, 1♀ (SEHU), 石門 (Shihmen), 17.V.1975, leg. M. Kubota; 2 exs. (TARI), same locality, 12.V.2012, leg. Y. L. Lin; Taitung: 23♂, 32♀ (TARI), Kotosho (= Lanyu Island, 蘭嶼), 10.III.–14.IV.1920, leg. J. Sonan & T. Okuni; 4♂ (TARI), same locality, III.–IV.1932, S. Hirayama; 15 exs. (TARI), same locality, 28.I.2010, leg. Y. T. Wang; 1 ex. (TARI), same locality, 17.III.2012, leg. J. C. Chen; 2 exs. (TARI), same locality, 1.IV.2014, leg. Y. T. Chung; 1 ex. (TARI), same locality, 7.IV.2015, leg. Y. T. Wang; 3 exs. (TARI), same locality, 7.V.2015, leg. Y. T. Chung; 1 ex. (TARI), same locality, 27.VII.2015, leg. Y. T. Wang; 1 ex. (TARI), Shouka (壽卡), 28.IV.2015, leg. Y. T. Chung; 1♂ (TARI), Taito (= Taitung, 台東), 25.II.–27.III.1919, leg. S. Inamura; 4 exs. (TARI), Taren (達仁), 17.IX.2008, leg. W. C. Wang; **THAILAND**. 1 ex. (BMNH), "Siam, Bowring" Chiang Mai: 9 exs. (BMNH), Chiang Dao res. nat. 10–23.III.2010, leg. Machálik. Kanchanaburi; 1♀ (SEHU), Doi Suthep, 3.V.1980, leg. Y. Komiya; 1♂ (SEHU), same locality, VI.1985; 1♀ (SEHU), Phuping Palace, 29.IV.1980, leg. K. Ikeda; 1♀ (SEHU), Whuay Kaeo Falls, 1.VI.1983, leg. Y. Komiya; Kanchanaburi: 1 ex. (BMNH), Sai Yok, 26.III.1988, leg. M. J. D. Brendell; 1♂ (SEHU), Tham Than Lot N. P., 15–16.II.1981, S. Ohmomo; Lanpang: 1♂, 1♀ (SEHU), Mae Lung Mountain, 20.V.1985, Y. Komiya; Mae Hong Son: 2♂♂ (BMNH), Ban Huai Po, 17–23.V.1991, leg. J. Horák; 1♂ (BMNH), Ban Si Lang, 23–31.V.1991, leg. J. Horák; Nan: 1♂, 2♀ (SEHU), 15.V.1993, leg. S. Ohmomo; Nan: 2 exs. (BMMH), Doi Phu Kha N. P., 22–26.IV.1999, leg. D. Hauck; Phrae: 2♂ (SEHU), Wieng Ko Sai N. P., 19.V.1985, leg. Y. Komiya.

Redescription. Length 5.5–8.8 mm, width 2.7–4.7 mm. General color variable (see "Color variations"). Antenna filiform in males (Fig. 3A), ratios of lengths of antennomeres I–XI 1.0 : 0.6 : 0.7 : 0.7 : 0.8 : 0.8 : 0.8 : 0.8 : 0.9 : 0.9 : 1.2; ratios of length to width from antennomeres I–XI 2.1 : 1.6 : 1.9 : 2.0 : 2.1 : 1.9 : 1.8 : 1.8 : 1.9 : 2.1 : 2.8; shorter in females (Fig. 3B), ratios of lengths of antennomeres I–XI 1.0 : 0.6 : 0.7 : 0.7 : 0.8 : 0.8 : 0.8 : 0.8 : 0.9 : 0.9 : 1.2; ratios of length to width from antennomeres I–XI 2.1 : 1.6 : 1.8 : 1.9 : 2.0 : 1.8 : 1.7 : 1.9 : 2.0 : 2.0 : 2.9. Pronotum 1.6–1.7 times wider than long; disc evenly convex, glabrous but with dense fine punctures; lateral margins straight in small individuals but slightly rounded in large individuals; apical margin slightly concave, basal margin slightly convex in small individuals, but producing posteriorly at middle in large individuals. Elytra 1.4–1.5 times longer than wide; parallel-sided, apices convergent; disc with coarse punctures arranged into longitudinal striae, with scarce, fine punctures between strial punctures. Aedeagus (Figs. 3C, 3D) slender, 6.1 times longer than wide; narrower in apical 1/6, apex narrowly rounded; moderately curved in lateral view; tectum membranous, with a paired, longitudinally sclerotized area; internal sac with elongate flagellum and two pairs of slender sclerites, one pair longitudinal, sinuous and basally connected, other pair separated and curved. Gonocoxae (Fig. 3G) separate; abdominal tergite IX longitudinal, basally narrowed; abdominal ventrite IX coiled, broad; coxites cylindrical, with a ring of long setae near apex; styli cylindrical, much narrower than coxites, with several long apical setae, surrounding by short setae. Ventrite VIII (Fig. 3F) in females wide and spiculum reduced, with a paired longitudi-

nally sclerotized area, dense, long setae along apical margin, a few setae of different lengths scattered near apex. Spermathecal receptaculum (Fig. 3E) slender, narrower than pump, not separated from pump; pump long and curved, apex widely rounded; sclerotized spermathecal duct slender, not coiled.

Sexual dimorphism. Apical margin of abdominal ventrite V truncate, slightly and medially convex in males, but widely rounded in females.

Color variations. Adults of *Phola octodecimguttata* display great variation in color patterns, depending on where they occur across the species' geographic distribution. Color patterns can be categorized into four major forms as follow:

(1) The octodecimguttata form (Figs. 4A–C): general color yellowish-brown; antenna black except three basal antennomeres; vertex with one black spot; pronotum with three black spots: one circular pair near midline of basal 1/3, and a single spot smaller and longitudinal at midline of apical 1/3; scutellum brown; elytra dark brown but with nine pairs of large yellow spots: two pairs near base, basal 1/3, middle, apical 1/3 respectively, one pair apically, with yellow band along basal margin extending from base of lateral margin to middle, sometimes connected with yellow spots; prothoracic ventrites yellowish-brown, meso-, and metathoracic, and abdominal ventrites dark brown but sides of abdominal ventrites more or less yellowish-brown; legs yellowish-brown, but apices of femora and bases of tibiae dark brown, tarsi more or less darker; typical of specimens from Australia and South India. Yellow spots enlarged and connected with other spots in some individuals (Fig. 4D); spots smaller in populations from Solomon Islands and Papua New Guinea. Populations from Sri Lanka (Fig. 4F) similar to those of Solomon Islands (Fig. 4E) and Papua New Guinea, with small yellow spots on elytra but with one additional pair of dark brown spots on pronotum between pair of circular spots and single longitudinal spot.

(2) The cybele form (Figs. 3G–I): similar to typical form of octodecimguttata, but longitudinal brown spot on pronotum more or less reduced, mesoventrite paler, with yellow band along base of lateral margin to apex, typical of specimens from eastern China, Taiwan, and Japan. Populations on islands surrounding China (such as Hong Kong, Kinmen Islands) (Figs. 4J, 4K) with yellow spots on elytra extremely enlarged, sometimes brown areas greatly reduced.

(3) The sedecimpustulata form (Figs. 1E–G): similar to those of octodecimguttata with small yellow spots on elytra, but general color reddish-brown, vertex and pronotum without black spots, paired yellow spots on apices and yellow bands along lateral margins reduced, metathoracic ventrites darker, legs similar typical octodecimguttata form; typical of specimens collected from western China (Yunnan), Myanmar, Peninsular Malaysia, Indonesia, and Thailand; black spots on vertex and pronotum present in few specimens. Specimens from Singapore, Brunei, and East Malaysia with one pair of yellow spots on apices of elytra (Fig. 4L).

(4) The dipa form (Figs. 2E–G): similar to typical octodecimguttata, but interior of lateral and posterior yellow spots on elytra brown; meso-, and metathoracic, and abdominal ventrites yellowish-brown.

Diagnosis. Adults of *Phola octodecimguttata* are easily separated from those of *P. decempustulata* with their characteristic color patterns; in addition, there are significant differences in female genitalic characters. Females of *P. octodecimguttata* have a broad spermathecal receptaculum (Fig. 3E), as broad as pump, and a broad, short duct (slender spermathecal receptaculum (Fig. 8C), narrower than pump, and extremely slender and coiled duct in *P. decempustulata*), and complete ventrite VIII with one pair of longitudinal dark bands (Fig. 3F) (medially separated ventrite VIII in *P. decempustulata* (Fig. 8B)).

Host plants. *Vitex rotundifolia* L. f. (Chûjô & Kimoto 1961; current study), *Vitex negundo* L. (Hsieh 2012), *V. negundo* var. *cannabifolia* (Siebold & Zucc.) Hand.-Mazz. (Chen 1964, 1985; Yu *et al*. 1996; current study); *Vitex trifolia* L. (current study).

Biological notes. Chen (1964, 1985) suggested that "*Phola octodecimguttata* is a primitive species of Chrysomelinae, and stated that the larvae are stem feeders on *Vitex cannobifloia* and construct tubiform nests with excrement on or between the branches. The larvae live in concealment with the anterior half of the body in the nest and the tip of the abdomen exposed".

However, in the current study larvae of this species were observed to be leaf feeders on *Vitex rotundifolia*. Females laid more than 30 eggs into one layer of young leaves (Fig. 5A). Larvae (Fig. 5C) hatched in four to five days. They produced a tube of faeces fixed to a leaf or branch as a shelter (Fig. 5B). The whole body was concealed under the shelter. The larval duration was 12 to 14 d. Mature larvae burrowed into soil and built underground chambers for pupation, which was surrounded by a few black silk fibers. Duration of the pupal stage (Fig. 5D) was seven to eight days (Lee & Cheng 2007). Host plants produced new leaves during early spring. Young larvae were observed feeding on new leaves on April 12, 2022 in Kinmen Island (Fig. 5E). Adults and larvae were found on May 7, 2007 at Qienshuiwan (淺水灣), northern Taiwan. Thus, *Phola octodecimguttata* is presumably an univoltine species, based on observations of adults during spring. Larval morphology was studied by Kimoto (1962). In the subtropical northern parts of its range, adults appear in spring.

Yi-Xuan Hsieh (謝怡萱) observed larvae and adults of this species feeding on leaves of *Vitex negundo* in South Taiwan. Larvae did not build tubes of faeces and were exposed (her blog: https://blog.xuite.net/mbbrgs/twblog1/137792188).

Distribution. Japan, China, Taiwan (Fig. 6), Thailand, Laos, Vietnam, Myanmar, South India, Sri Lanka, Malaysia, Singapore, Brunei, Indonesia, Papua New Guinea, Solomon Island, Australia.

Phola decempustulata (Baly, 1864), com. nov.

Chalcolampra decempustulata Baly, 1864: 619 (Batchian = Becan Island); Baly 1867:281 (redescription with illustration of habitus); Mohamedsaid 1997:121 (Peninsular Malaysia: Negeri Sembilan, Perak).

Types. 1♀ (BMNH): "Bou [h, w] // SYN- / TYPE [p, w; circle label with blue border] // Type [h, w] // Type [p, w; circle label with red border] // Chalcolampra / 10 pustulata / Baly / Batchian [w, b] // Type / likely / Coll Wallace"; 1♀ (BMNH): "Bou [h, w] // SYN- / TYPE [p, w; circle label with blue border] // Type [h, w]".

Specimens examined. EAST MALAYSIA. Sarawak: 1♀ (BMNH), Quop, IV.1914, leg. G. E. Bryant; 1♀ (TARI), 4th Division, Gn. Mulu NP., V.–VIII.1978, leg. P. M. Hammond & J. E. Marshall, at light; **INDONESIA.** Sulawesi: 1 ex. (BMNH), Sulawesi Utara, Dumoga-Bone N. P., "Hog's Back" Camp, Lowland Forest, 492 m, IX, 1985, Malaise trap, Project Wallace; **THAILAND.** Chiang Mai: 1♀ (SEHU), Doi Pui, 3.V.1984, leg. M. Akiyama.

Redescription (Female). Length 4.4–5.0 mm, width 2.4 mm. General color (Figs. 7A–C) yellowish-brown, but meso- and meta thoracic, and abdominal ventrites blackish-brown; four or five apical antennomeres darker; five pairs of yellow spots on elytra, two pairs near base, two at middle, one at apical 1/3. Antenna filiform (Fig. 8A), antennomeres VII–X apically widened, ratios of lengths of antennomeres I–XI 1.0 : 0.6 : 0.7 : 0.6 : 0.7 : 0.7 : 0.7 : 0.8 : 0.8 : 0.8 : 1.2; ratios of length to width from antennomeres I–XI 2.2 : 1.9 : 2.3 : 2.0 : 2.1 : 2.0 : 1.6 : 1.8 : 1.8 : 1.8 : 2.7. Pronotum 1.7 times wider than long; disc slightly or moderately convex, glabrous but with sparse fine punctures mixed with tiny punctures; lateral margins slightly rounded apical margin slightly concave, basal margin slightly convex. Elytra 1.5 times

longer than wide; parallel-sided, apices convergent; disc with coarse punctures arranged into longitudinal striae, with scarce fine punctures between strial punctures. Gonocoxae (Fig. 8D): separated; abdominal tergite IX longitudinal, basally narrowed; abdominal ventrite IX coiled, wide; coxites cylindrical, with one ring of long setae near apex; styli cylindrical, much narrower than coxites, with several long setae on apex. Ventrite VIII (Fig. 8B) wide and spiculum reduced, with one longitudinal membranous area, several long setae mixed few short setae along apical margin. Spermathecal receptaculum (Fig. 8C) slender, narrower than pump, not separated from pump; pump long and curved, apex widely rounded; sclerotized spermathecal duct extremely slender and coiled.

Variations. Specimens from Sarawak (Figs. 7D–F) have coarser punctures on the pronotum.

Diagnosis. As diagnosis in *Phola octodecimguttata* (Fabricius, 1775).

Biology. Unknown.

Distribution. Indonesia (Becan Island, Sulawesi: new record), Malaysia, Thailand (new record).

DISCUSSION

The widespread distribution of *Phola octodecimguttata* is likely associated with one of its host plants- *Vitex rotundifolia*. This plant is native to seashores throughout the Pacific. Its range includes continents and islands stretching from India east to Hawaii and from Korea south to Australia (Wikipedia n.d.). *Phola octodecimguttata* has a similar distribution except for its absence from Korea and Hawaii. These leaf beetles were found on more than 20 small islands in Japan (Chûjô 1935a; Nakane & Kimoto 1961a; Kimoto & Gressitt 1966; Azuma & Kimoto 1978, 1981; Kamezawa 2015; Matsumura *et al*. 2018; Shigetoh & Yoshitake 2018; Suenaga *et al*. 2018; Shigetoh 2019, 2020a, 2020b, 2020c; Shigetoh *et al*. 2019). In Taiwan, Chûjô (1958) recorded it from Penghu Island (澎湖) and Lanyu Island (蘭嶼). It was also found on Liuchiu Island (琉球嶼) based on the historical collection at the TARI. Recently, it was recorded from Lieyu Island (烈嶼) and Dadan Island (大膽島) by Chang (2017). The first author found it on Kinmen Island (金門島) and Beigan Island (北竿島) (Figs. 5F, 5G) by searching *V. rotundifolia* plants. In addition, this species was found on Dongji Island (東吉嶼) (Fig. 5H), a small island of the Penghu Island Archipelago. There is substantial supportive evidence of long-distance dispersal by drift fruits of vitex (Wikipedia n.d.). This may explain the frequent presence of *Vitex rotundifolia* in seashore habitats. The colonization of *P. octodecimguttata* on so many islands and coastal areas across the Pacific and Indian Oceans is likely associated with this peculiar features of their host plants. Even though more data are required to determine the exact dispersal mechanisms for *P. octodecimguttata*, we can conclude that this species is an excellent disperser and will be recorded from additional small islands throughout its range in the future.

We also found that some records of *P. octodecimguttata* are located far inland (e.g., NW Thailand, Laos, Yunnan), outside the range of *V. rotundifolia*. It seems likely that all these inland populations, primarily in China and Indochina, use other Vitex species, including but maybe not exclusively *V. negundo* as their host plants.

Phola octodecimguttata shows a wide range of geographically correlated variation in color patterns, which has led previous authors to treat its populations under multiple species names. However, none of the color forms originally described as separate species show significant differences in genitalia and the size differences stated by Kimoto & Gressitt (1981) could not be confirmed after a larger material was examined, so we must conclude that they are indeed forms of a single species. Aside from *P. octodecimguttata*, we only confirmed *P. decempustulata* (here transferred from *Chalcolampra*) as a separate species of *Phola*, leaving only two verified valid species within the genus.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the Taiwan Chrysomelid Research Team (TCRT) and citizen scientists, including Jung-Chang Chen (陳 榮 章), Hou-Jay Chen (陳厚潔), Yi-Ting Chung (鍾奕霆), Yi-Chang Liao (廖一璋), Yu-Log Lin (林毓隆), Ui-Ka Ong (王惟加), Yu-Tang Wang (王宇堂), and Su-Fang Yu (余素芳) for assistance in collecting material. We thank Chi-Lung Lee (李其龍), and Hsing-Tzung Cheng (鄭興宗) for photos of specimens, Hsing-Tzung Cheng (鄭興宗), Ming-Yao Chiang (江明耀), Yi-Chang Liao (廖 一 璋), and Su-Fang Yu (余素芳) for field photography, and Chih-Kai Yang for identification of host plants. We especially thank Jan Bezděk for studying and taking photos of the syntypes of *Chrysomela octodecimguttata* Fabrucius, Anna Jerve for types of *Phyllophila sedecimpustulata* Stål and *Chalcolampra* (*Phyllophila*) *cybele* Stål, Bernd Jäger and Alexey Moseyko for the type of *Phola keyserlingi* Weise, Masahiro Ohara and Takuya Takemoto for loan specimens at the SEHU. We thank Chang-Chin Chen (陳常卿) for assisting our study in various ways. We thank Chris Carlton for reading the draft and editing for American English style. This study was supported by the Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Ministry of Agriculture 112AS-5.5.4-BQ-B2.

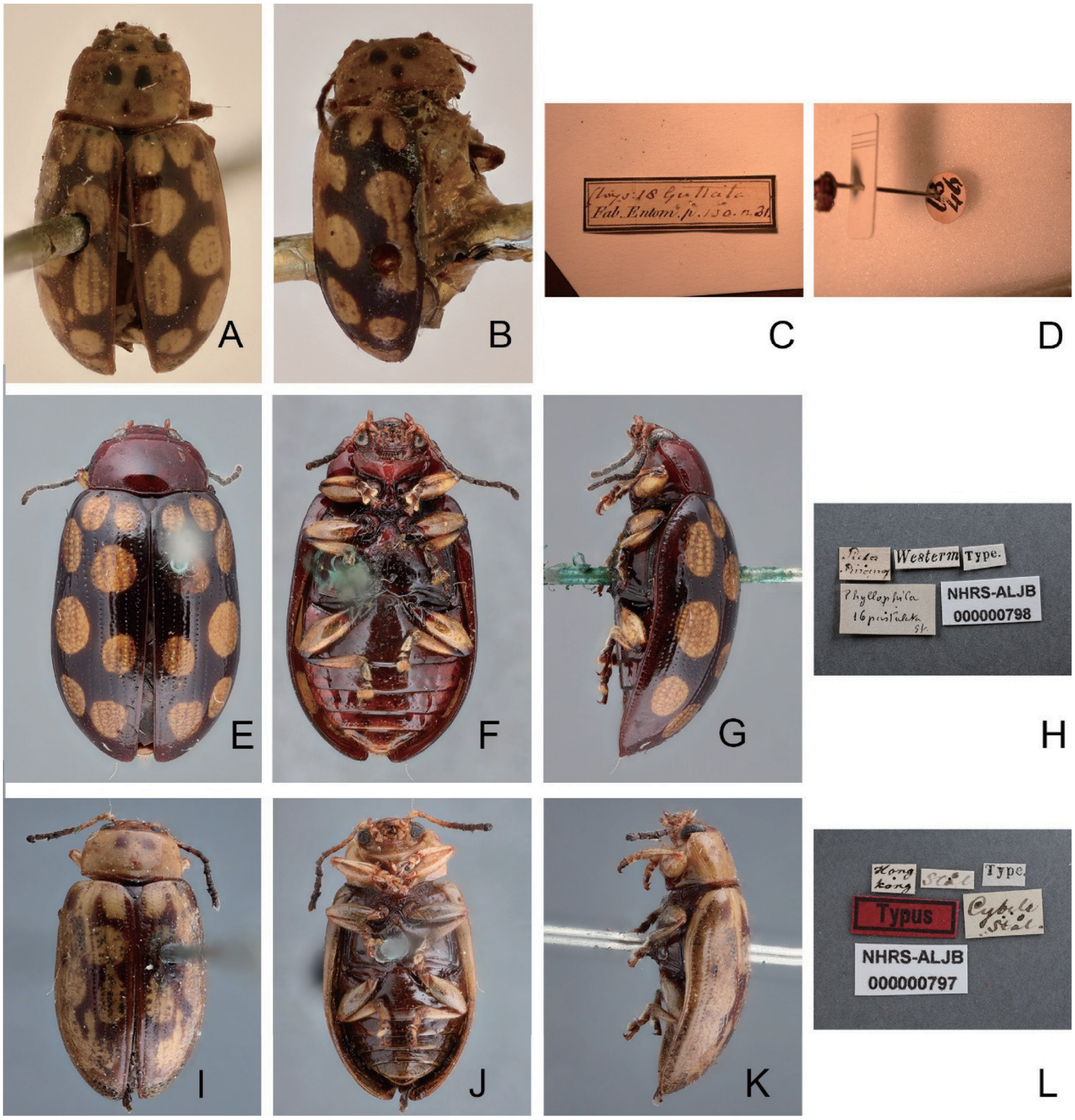


Fig. 1. Type specimens and labels of *Phola octodecimguttata* and its synonyms. A–D: *Chrysomela octodecimguttata*, A. lectotype, dorsal view; B. paralectotype, dorsal view; C. one label; D. the circle label pinned with damaged syntype; E–H: *Phyllophila sedecimpustulata*, E. holotype, dorsal view; F. ditto, ventral view; G. ditto, lateral view; H. labels; I–L: *Chalcolampra* (*Phyllophila*) *cybele*, I. holotype, dorsal view; J. ditto, ventral view; K. ditto, lateral view; L. labels.

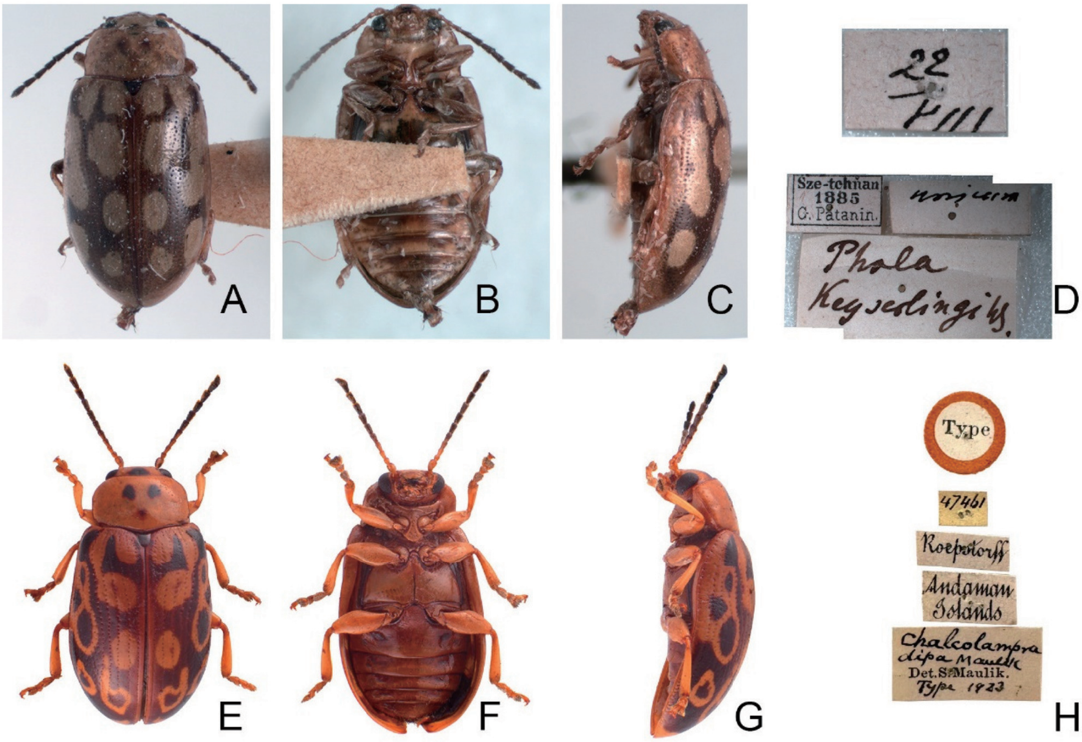


Fig. 2. Type specimens and labels of synonyms of *Phola octodecimguttata*. A–D: *Phola keyserlingi*, A. holotype, dorsal view; B. ditto, ventral view; C. ditto, lateral view; D. labels; E–H: *Chalcolampra dipa*, E. holotype, dorsal view; F. ditto, ventral view; G. ditto, lateral view; H. labels.

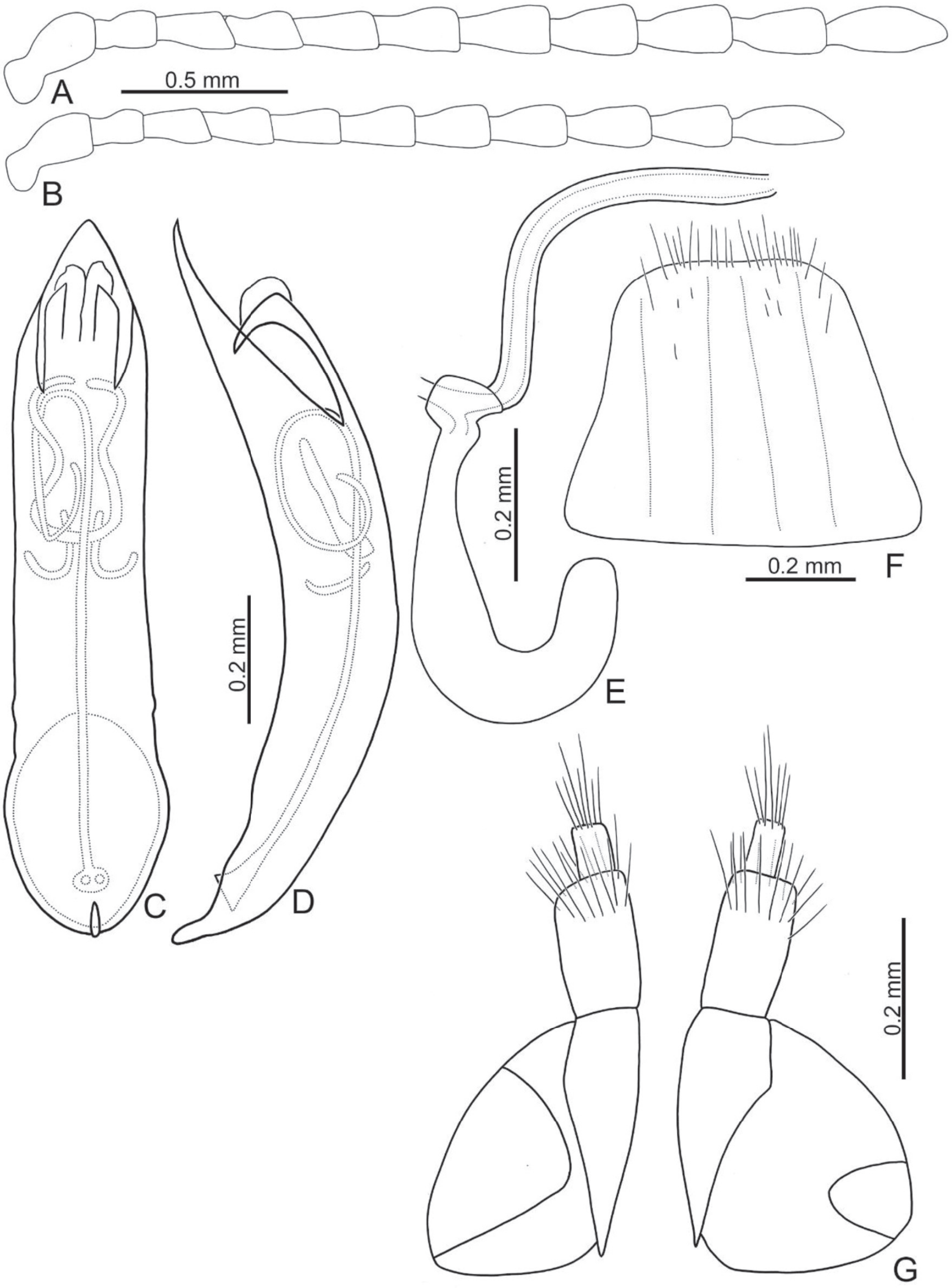


Fig. 3. Diagnostic characters of *Phola octodecimguttata*. A. antenna, male; B. antenna, female; C. aedeagus, dorsal view; D. ditto, lateral view; E. spermatheca; F. abdominal ventrite VIII, female; G. gonocoxae.

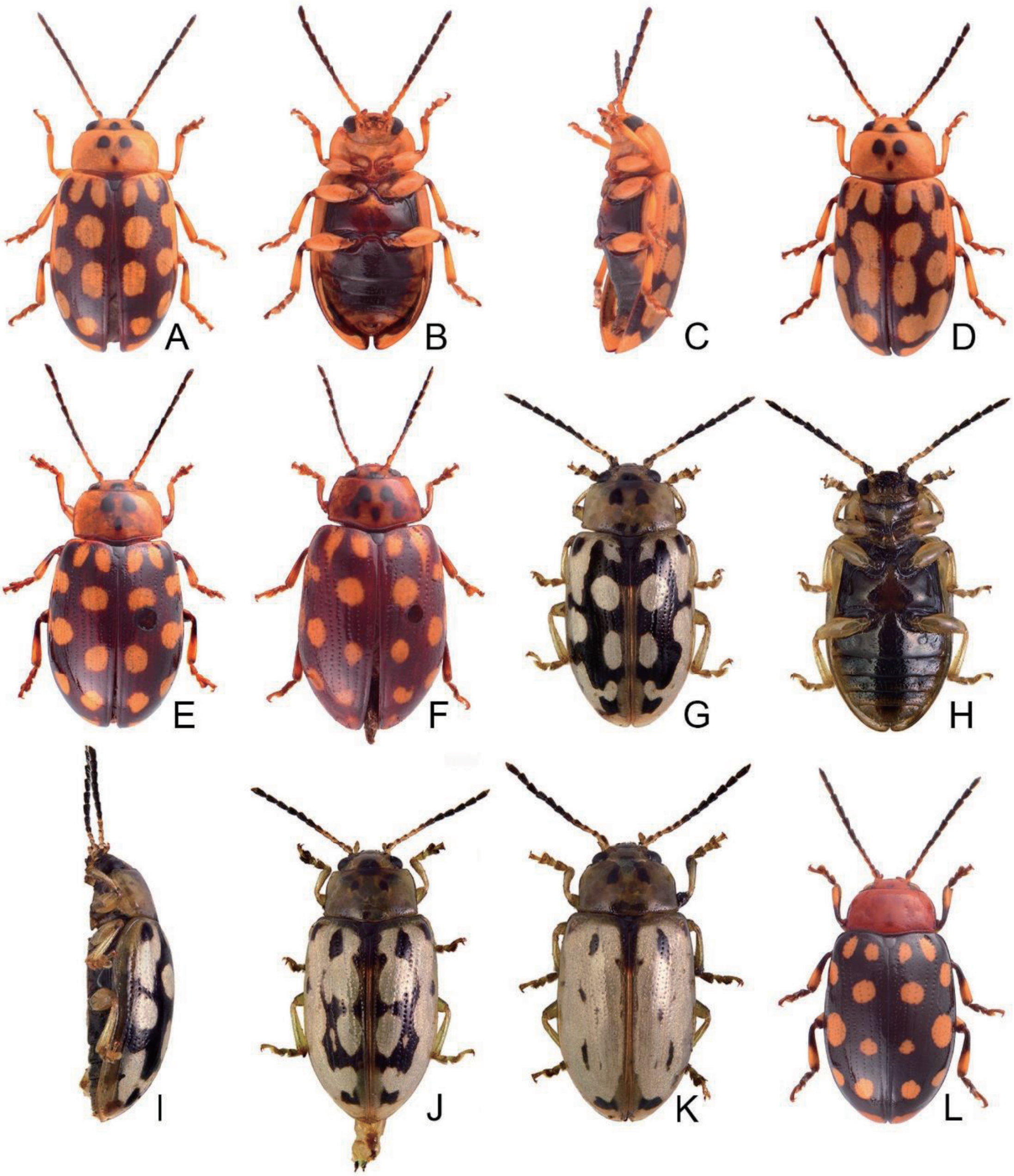
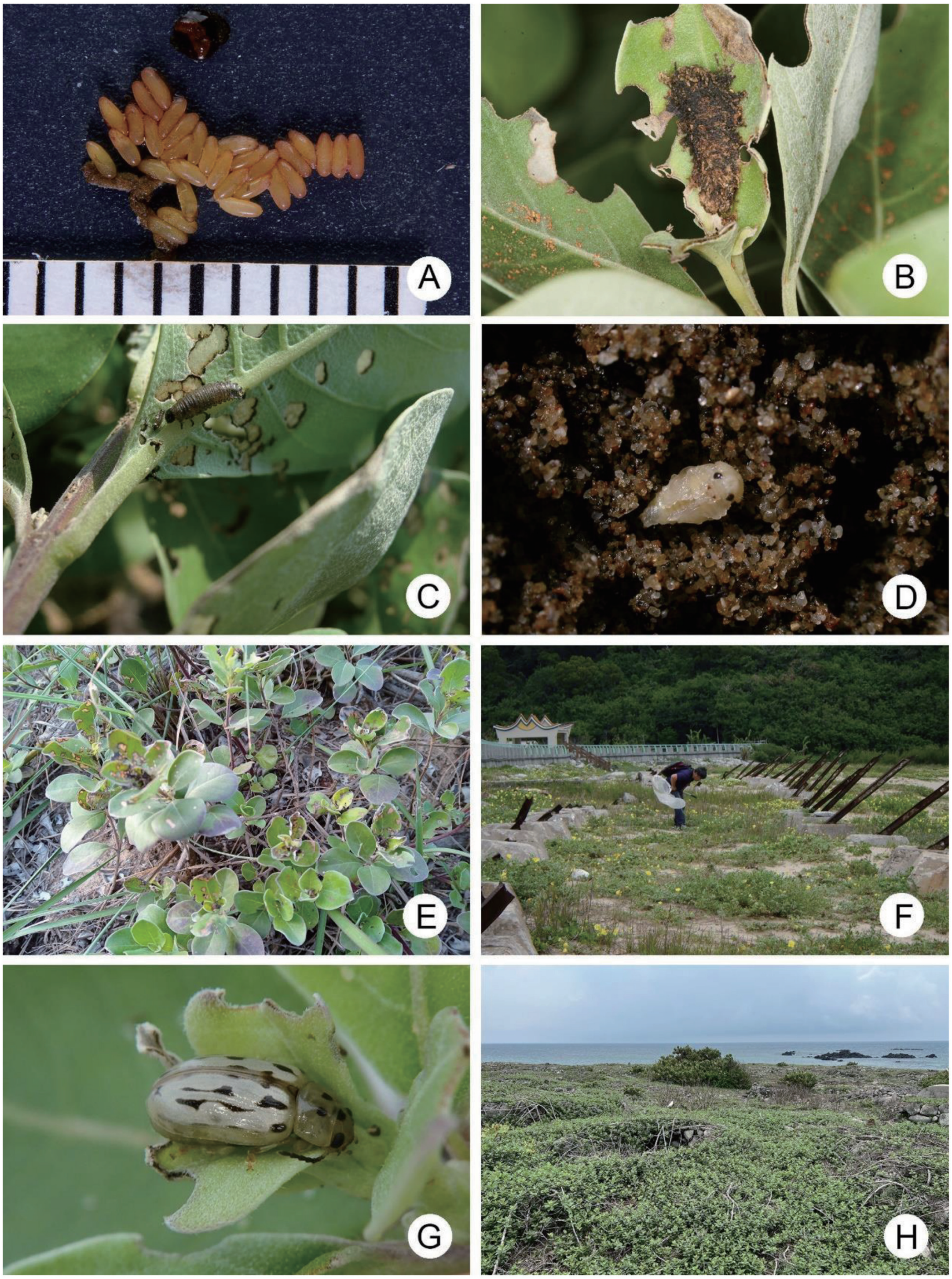


Fig. 4. Color variations of *Phola octodecimguttata*. A. from Australia, dorsal view; B. ditto, ventral view; C. ditto, lateral view; D. from same population, dorsal view; E. from Solomon Islands, dorsal view; F. from Sri Lanka, dorsal view; G. from Taiwan, dorsal view; H. ditto, ventral view; I. ditto, lateral view; J. from Kinmen Island, dorsal view; K. from same population, dorsal view; L. from Brunei, dorsal view.



Figs. 5. Field photographs of *Phola octodecimguttata*. A. eggs; B. fecal tunnel nest on leaf with larva concealed inside; C. larvae and their feeding marks on the leaves of the host plant; D. pupa; E. young shoots and larvae on Kinmen Island (金門島); F. microhabitat on beach of Beigan Island (北竿島); G. adult found on beach of Beigan Island (北竿島); H. microhabitat on beach of Dongji Island (東吉嶼).

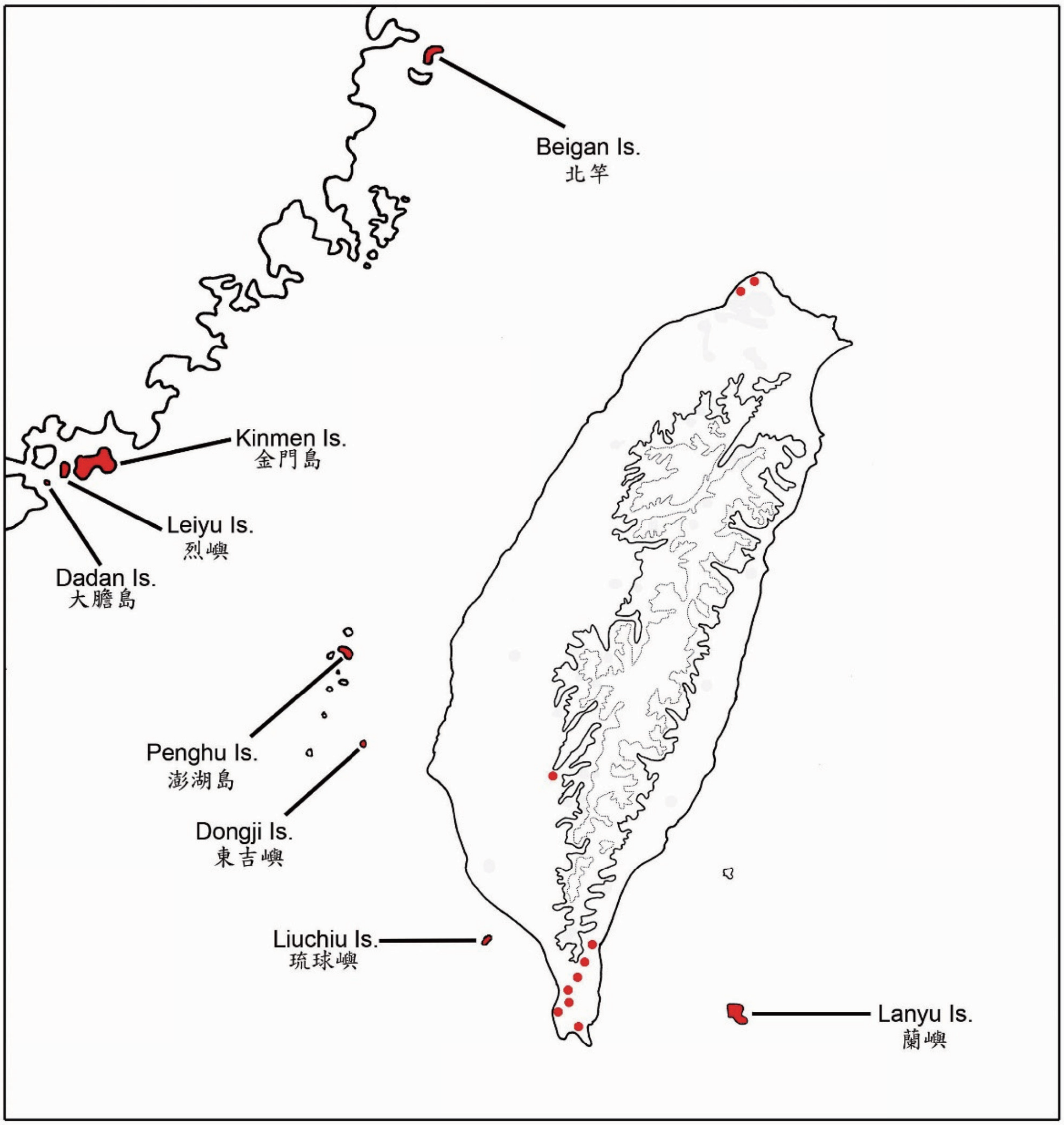


Fig. 6. Distribution map of *Phola octodecimguttata* in Taiwan, marked with red; topographic contour lines: black: 1000 m, gray: 2000 m.

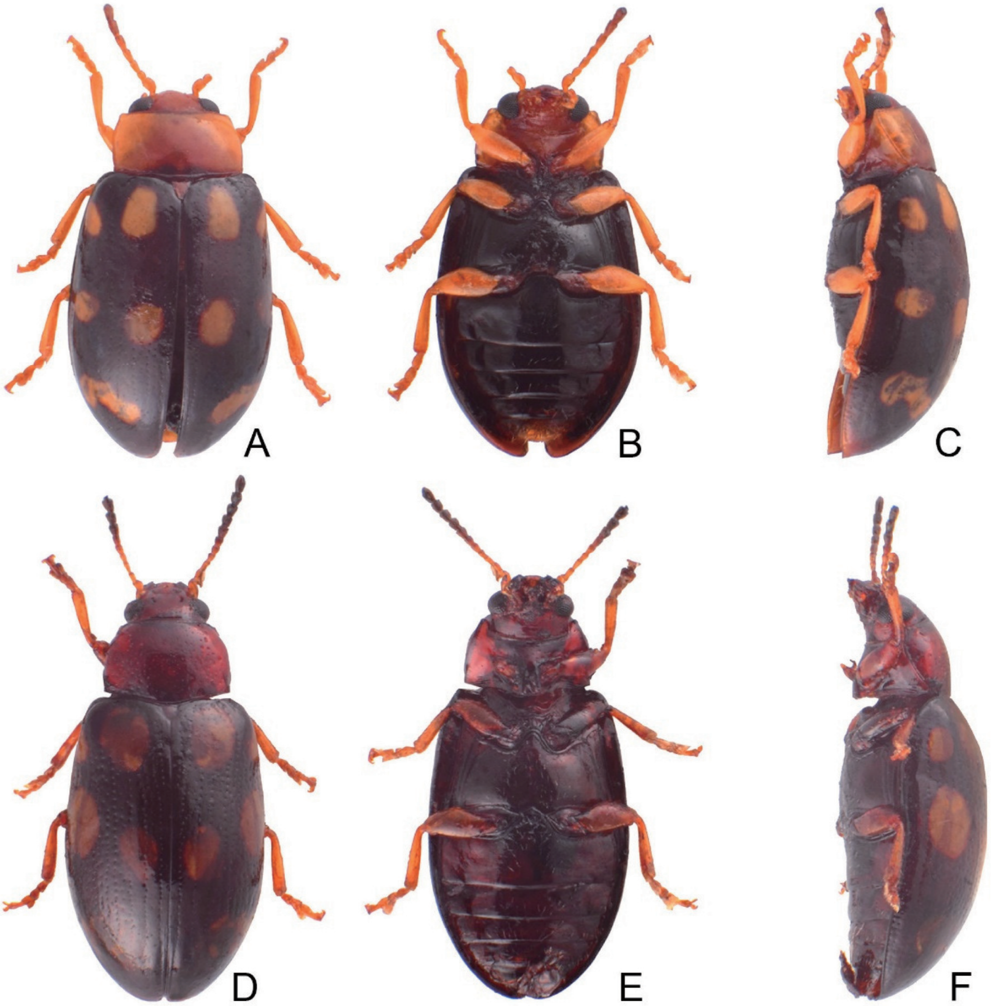


Fig. 7. Color variations of *Phola decempustulata*, female. A. from Becan Island, dorsal view; B. ditto, ventral view; C. ditto, lateral view; D. from Sarawak, dorsal view; E. ditto, ventral view; F. ditto, lateral view.

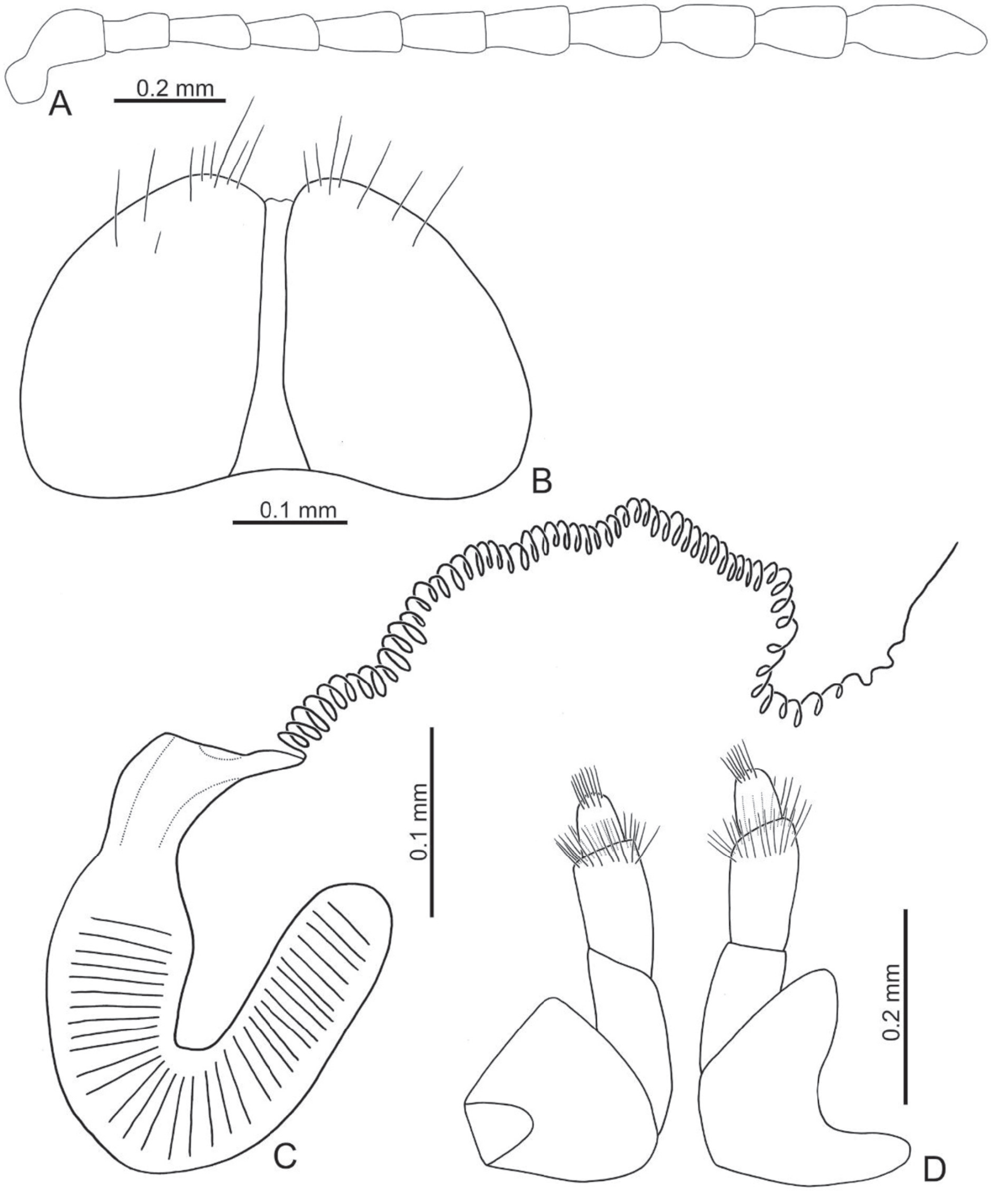


Fig. 8. Diagnostic characters of *Phola decempustulata*, female. A. antenna; B. abdominal ventrite VIII, female; C. spermatheca; D. gonocoxae.

REFERENCES

Australian Biological Resources Study (ABRS). 2020. Australian Faunal Directory. Australian Biological Resources Study, Canberra, Australia. https://biodiversity.org.au/afd/taxa/Phola (visit on 27/07/2023).

Azuma, S. and S. Kimoto. 1978. The chrysomelid fauna of the Yonaguni Island, Ryukyus (Coleoptera). Sci. Bull. Coll. Agric. Univ. Ryukyus 25:123–127. (in Japanese)

Azuma, S. and S. Kimoto. 1981. A list of the Chrysomelidae (Coleoptera) from the detached Islands in Okinawa. Sci. Bull. Coll. Agric. Univ. Ryukyus 28:49–55. (in Japanese with English title)

Baly, J. S. 1855. Monograph of the Australian species of *Chrysomela*, *Phyllocharis* and allied genera. Trans. Entomol. Soc. London 8:170–186. doi:10.1111/j.1365-2311.1855.tb02669.x

Baly, J. S. 1864. Descriptions of new Phytophaga. Trans. Entomol. Soc. London 11:611–624. doi:10.1111/j.1365-2311.1864.tb00611.x

Baly, J. S. 1867. Phytophaga Malayana; a revision of the phytophagous beetles of the Malay Archipelago, with descriptions of the new species collected by Mr. A. R. Wallace. Trans. Entomol. Soc. London 3(4):77–300.

Boisduval, J. B. A. 1835. Voyage de découvertes de l'Astrolabe, execute par ordre du Roi pendant les années 1826-1827-1828-1829 sous le commandement de M. J. Dumont d'Urville. Faune entomologique de l'Océan Pacifique: avec l'illustration des insects nouveaux recueillis pendant le voyage. Deuxième partie. Coléptères et autres orders. J. Tastu, Paris. 716 pp. (in French)

Chang, Y. J. 2017. A Field Guide to the Insects of Lieyu. Kinmen National Park. Kinmen, Taiwan. 343 pp. (in Chinese)

Chen, S. H. 1934. Recherches sur les Chrysomelinae de la Chine et du Tonkin. Société entomologique de France. Paris. 104 pp. (in French)

Chen, S. H. 1936. Catalogue des Chrysomelinae de la Chine, de 1'Indochine et du Japon. Notes Entomol. Chin. 3(5):63–102. (in French)

Chen, S. H. 1938. Chrysomelidae et Halticinae récoltés par Monsieur Kjell Kolthoff dans le Province du Kiangsu (Chine). Ark. F. Zool. 30B(4):1–4. (in French)

Chen, S. H. 1964. Evolution and classification of the chrysomelid beetles. Acta Entomol. Sinica 13:469–483.

Chen, S. H. 1985. Phylogeny and classification of the Chrysomeloidea. Entomography 3:465–475.

Chûjô, M. 1935a. Chrysomelidae of Loo-Choo Archipelago (I). Trans. Nat. Hist. Soc. Formosa 25:69–90.

Chûjô, M. 1935b. Chrysomelidae of Loo-Choo Archipelago (II). Trans. Nat. Hist. Soc. Formosa 25:203–211.

Chûjô, M. 1958. A taxonomic study on the Chrysomelidae (Insecta, Coleoptera) from Formosa. Part X. Subfamily Chrysomelinae. Quart. J. Taiwan Mus. 11:1–85. doi:10.6532/QJTM.195806_11(1_2).0001

Chûjô, M. and S. Kimoto. 1961. Systematic catalog of Japanese Chrysomelidae (Coleoptera). Pac. Ins. 3:117–202.

Daccordi, M. 1994. Notes for phylogenetic study of Chrysomelinae, with descriptions of new taxa and a list of all the known genera (Coleoptera: Chrysomelidae, Chrysomelinae). p.60–84. *in*: Proceedings of the Third International Symposium of the Chrysomelidae. 1992. Beijing, China. Backhuys, Leyden.

Fabricius, J. C. 1775. Systema Entomologiae Sistens Insectorvm Classes, Ordines, Genera, Species, Adiectis Synonymis, Locis, Descriptionibvs, Observationibvs. Libraria Kortii, Flensbvrgi et Lipsiae. 832 pp. (in Latin). doi:10.5962/bhl.title.36510

Fabricius, J. C. 1781. Species Insectorum Exhibentes Eorum Differentias Specificas, Synonyma Auctorum, Loca Natalia, Metamorphosin, Adjectis Observationibus. Tome I. Carol Ernest Bohni, Hamburgi et Kilonii. 552 pp. (in Latin)

Fabricius, J. C. 1792. Entomologia Systematica Emandata et Aucta. Secundum Classes, Ordines, Genera, Species Adjectis Synonimis, Locis, Observationibus, Descriptionibus. Tomus I. Impensis Christ. Gottl. Proft. Hafniae. 868 pp. (in Latin). doi:10.5962/bhl.title.125869

Fabricius, J. C. 1801. Systema Eleutheratorum: Secundum Ordines, Genera, Species Adiectis Synonymis, Locis, Observationibus, Descriptionibus. Tomus I. Bibliopolii Academici Novi, Kiliae. 506 pp. (in Latin).

Fairmaire, M. L. 1888. Coléptères de l'intérieur de la Chine. Ann. Soc. Entomol. Belg. 32:7–46. (in French)

Gmelin, J. F. 1790. Caroli a Linné, systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Editio decima tertia, aucta, reformata. Tom I. Pars IV. Classis V. Insecta. Georg Enanuel Beer, Lipsiae, p.1517–2224. (in Latin)

Gressitt, J. L. and S. Kimoto. 1963. The Chrysomelidae of China and Korea, Part 2. Pac. Ins. Mon. 1B:301–1026.

Guenée, M. A. 1852. Histoire Naturelle des Insectes. Species Général des Lépidoptéres. Tome Sixiéme. Noctuélites. Tome 2. Librairie Encyclopédique de Roret.

Paris. 444 pp.

Harold, E. van 1874. Chrysomelidae (Pars I.). *in*: Catalogus Coleopterorum, Tom. XI. G. Beck, Manachii. p.3233–3478. (in Latin)

Jacoby, M. 1884. Descriptions of new genera and species of phytophagous Coleoptera from Sumatra. Notes Leyden Mus. 6:9–70.

Jacoby, M. 1896. Descriptions of the new genera and species of phytophagous Coleoptera obtained by Mr. Andrewes in India. Part II Chrysomelinae, Halticinae and Galerucinae. Ann. Soc. Entomol. Belg. 40:250–304. doi:10.5962/bhl.part.2024

Kamezawa, H. 2015. Occurrence of *Chalcolampra octodecimguttata* in the southern part of the Bôsô-hantô Peninsula. Gekkan-Mushi 533:52–54. (in Japanese)

Kimoto, S. 1962. Descriptions of immature stages of Japanese Chrysomelinae belonging to the generic groups *Chrysolina*, *Gonioctena*, *Phola* and *Phaedon* (Coleoptera). J. Fac. Agric. Kyushu Univ. 12:89–103. doi:10.5109/22695

Kimoto, S. 1964a. The Chrysomelidae of Japan and the Ryukyu Islands. V. J. Fac. Agric. Kyushu Univ. 13:263–286. doi:10.5109/22723

Kimoto, S. 1964b. A list of specimens of Chrysomelidae from Taiwan preserved in the Naturhistorisches Museum/Wien (Insecta: Coleoptera). Ann. Naturhistor. Mus. Wien 68:485–490.

Kimoto, S. 1966. A list of the chrysomelid specimens of Taiwan preserved in the Zoological Museum, Berlin. Esakia 5:21–38. doi:10.5109/2351

Kimoto, S. 1969. Notes on the Chrysomelidae from Taiwan II. Esakia 7:1–68. doi:10.5109/2358

Kimoto, S. and J. L. Gressitt. 1966. The Chrysomelidae of the Ryukyu Archipelago. Pac. Ins. 8:467–577.

Kimoto, S. and J. L. Gressitt. 1981. Chrysomelidae (Coleoptera) of Thailand, Cambodia, Laos and Vietnam. II. Crytrinae, Cryptocephalinae, Chlamisinae, Lamprosomatinae and Chrysomelinae. Pac. Ins. 23:286–391.

Kippenberg, H. 2010. Chrysomelinae. p.390–443. *in*: Catalogue of Palaearctic Coleoptera, Vol. 6. (Löbl, I. and A. Smetana, eds.) Apollo Books. Stenstrup, Denmark. 924 pp.

Lee, C. F. and H. T. Cheng. 2007. The Chrysomelidae of Taiwan, 1. Sishou-Hills Insect Observation Network, Taipei, Taiwan. 199 pp. (in Chinese)

Matsumura, M., S. Nobayashi, M. Osada, T. Kohama, and J. Yamazaki. 2018. Distributional records of beetles (Coleoptera) from Izena-jima Is. and Iheya-jima Is. in 2017. Insects of Loochoos, Ginowan 42:8–15. (in Japanese)

Maulik, S. 1926. The Fauna of British India, Including Ceylon and Burma. Coleoptera; Chrysomelidae (Chrysomelinae and Halticinae). Taylor and Francis. London. 442 pp.

Mohamedsaid, M. S. 1993. The Chrysomelidae (Coleoptera) of Danum Valley, Sabah, Malaysia. I. Criocerinae, Clytrinae, Cryptocephalinae and Chrysomelinae. Sains Malays. 22(3):1–7.

Mohamedsaid, M. S. 1997. Nota mengnai kumbang daun subfamli Chrysomelinae dari semenanjung Malaysia (Coleoptera: Chrysomelidae). Serangga 2(1):119–124. (in Malaysian)

Nakane, T. and S. Kimoto. 1961a. Entomological results from the scientific survey of the Tokara Islands, Coleoptera: Chrysomelidae. Bull. Osaka Mus. Nat. Hist. 13:72–79.

Nakane, T. and S. Kimoto. 1961b. A list of chrysomelid-beetles collected by Dr. T. Shiraki from the Loochoo Islands, with descriptions of new species I (Coleoptera). Kontyû 29:14–21.

Reid, C. A. M. 2006. A taxonomic revision of the Australian Chrysomelinae, with a key to the genera (Coleoptera: Chrysomelidae). Zootaxa 1292:1–119. doi:10.11646/zootaxa.1292.1.1

Shigetoh, H. 2019. New distribution records of chrysomelid beetles (Coleoptera, Chrysomelidae) from Tonaki-jima Is., the Okinawa Isls., Central Ryukyus, Southwestern Japan. Sayabane N. S. 33:20–24. (in Japanese with English abstract)

Shigetoh, H. 2020a. Leaf beetles (Coleoptera, Chrysomelidae) collected on Tsuken-jima Is., the Okinawa Isls., southwestern Japan. Gekkan-Mushi 587:42–45. (in Japanese with English abstract)

Shigetoh, H. 2020b. Distributional records of leaf beetles (Coleoptera, Chrysomelidae) from Ou-jima Island in Nanjo City, Okinawa Islands, central Ryukyus, southwestern Japan. Fauna Ryukyuana 58:47–56. (in Japanese with English abstract)

Shigetoh, H. 2020c. The leaf beetle fauna (Coleoptera, Chrysomelidae) of Yoron-jima Is., the Amami Isls., Central Ryukyus, southwestern Japan. Elytra, N. S. 10:147–164.

Shigetoh, H. and H. Yoshitake. 2018. Leaf beetles (Coleoptera, Chrysomelidae) collected in winter on Yoro-jima Island, the Amami Islands, central Ryukyus, southwestern Japan. Gekkan-Mushi 568:34–37. (in Japanese with English abstract)

Shigetoh, H., H. Yoshitake, and Y. Tamadera. 2019. Leaf beetles (Coleoptera, Chrysomelidae) new for Ou-shima Is. Near Kume-jima Is. In the Okinawa Isls., Central Ryukyus, Southeastern Japan. Elytra New Series 9:145–148.

Stål, C. 1857. Till Kännedomen af Phytophaga. Öfvers.

Kongl. Vetensk.-Akad. Förh. 14:53–63. (in Swedish)

Stål, C. 1860. Till Kännedomen om Chrysomelidae. Öfvers. Kongl. Vetensk.-Akad. Förh. 17:455–470.

Suenaga, H., H. Shigetoh, and H. Yoshitake. 2018. Distribution records of leaf beetles (Coleoptera, Chrysomelidae) from Tokunoshima Is., the Amami Isls., central Ryukyus, Southwestern Japan (I). Elytra, N. S. 8:103–113.

Takahashi, S. 2012. Chrysomelidae (exclusive of Bruchinae and Donaciinae). p.239–372. *in*: Specimen list of Coleoptera in the Insect Collection of the Osaka Museum of Natural History (Part 2). (Shiyake, S. ed.) Special Publications from the Osaka Museum of Natural History, Volume 44. Osaka Museum of Natural History. Osaka. 372 pp.

Wang, J. and X. Yang. 2006. Fauna of Chrysomelidae of Gansu Province. Gansu Science Technology Press. Lanzhou, China. 296 pp. (in Chinese)

Wang, J., X. Yang, S. Wang, Y. Wu, J. Yao, and W. Li. 1998. Fauna of Chrysomelidae of Wuyishan Nature Reserve. China Forestry Publishing House. Beijing, China. 213 pp. (in Chinese with English abstract)

Weise, J. 1890. Insecta, a Cl. G. N. Potanin in China et in Mongolia novissime lecta. XVI. Chrysomelidae et Coccinellidae (Appendix). Hor. Soc. Entomol. Ross. 24:477–492. (in Germany)

Weise, J. 1916. Coleopterorum Catalogus. Pars 68. Chrysomelidae: 12. Chrysomelinae. W. Junk. Berlin. 255 pp.

Wikipedia. n.d. *Vitex rotundifolia*. https://en.wikipedia.org/wiki/Vitex_rotundifolia (visit on 05/01/2023)

Winkler, A. 1930. *Chalcolampra octodecimguttata* p.1265–1392. *in*: Catalogus Coleopterorum regionis palaearcticae. [1924–1932]. (Winkler, A. ed.) Albert Winkler. Wien. 1698 pp.

Yamazaki, J., M. Matsumura, T. Kohama, M. Osada, and S. Nobayashi. 2019. Insect list of Iheyajima Island and Nohojima Island. p.25–36. *in*: Survey Reports on Natural History, History and Culture of Izenajima and Iheyajima Islands, Okinawa Prefectural Museum and Art Museum. Okinawa Prefectural Museum and Art Museum. Okinawa. 240 pp.

Yang, X., S. Ge, R. Nie, Y. Ruan, and W. Li. 2015. Chinese Leaf Beetles. Science Press. Beijing, China. 507 pp.

Yu, P., S. Wang, and X. Yang. 1996. Economic Insect Fauna of China, Fasc. 54. Coleoptera: Chrysomeloidea (II). Science Press. Beijing, China. 324 pp.

瘦金花蟲屬 (*Phola* Weise, 1890) 的分類回顧 (鞘翅目：金花蟲科：金花蟲亞科)

李奇峰 [1,*] Michael F. Geiser[2]

摘要

李奇峰、Michael F. Geiser。2023。瘦金花蟲屬 (*Phola* Weise, 1890) 的分類回顧 (鞘翅目：金花蟲科：金花蟲亞科)。台灣農業研究 72(3):197–218。

本研究重新評估十八斑瘦金花蟲 (*Phola octodecimguttata* (Fabricius, 1775)) 及其同物異名，經由檢查模式標本及其生殖器特徵，本研究支持 *Phyllophila sedecimpustulata* Stål, 1857 是十八斑瘦金花蟲的同物異名，而 *Chalcolampra dipa* Maulik, 1926 則為新的同物異名；此研究並討論十八斑瘦金花蟲能夠在許多小島立足的能力。此外，將十斑瘦金花蟲 (*Chalcolampra decempustulata* Baly, 1863) 轉移至瘦金花蟲屬並重新描述。

關鍵詞：金花蟲、分類學、唇形科、牡荊屬、島嶼生物學。

投稿日期：2023 年 7 月 7 日；接受日期：2023 年 7 月 26 日。

* 通訊作者：chifeng@tari.gov.tw
1 農業部農業試驗所應用動物組聘用研究員。台灣 台中市。
2 倫敦自然史博物館鞘翅目部門管理員。英國 倫敦。

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 72(3):219–236 (2023)
DOI:10.6156/JTAR.202309_72(3).0003

研究報告

台灣本土白殭菌於咖啡果小蠹之田間自然感染率及菌株篩選

陳柏宏[1] 梁鈺平[1] 倪蕙芳[2,*]

摘要

陳柏宏、梁鈺平、倪蕙芳。2023。台灣本土白殭菌於咖啡果小蠹之田間自然感染率及菌株篩選。台灣農業研究 72(3):219–236。

白殭菌 (*Beauveria bassiana*) 為目前國外防治咖啡果小蠹 (*Hypothenemus hampei*) 重要微生物資材，由於我國現行尚無白殭菌商品可供咖啡產業應用，故本研究目的一方面調查此菌於本土咖啡園自然感染率，另一方面收集本土白殭菌菌株，透過分離、鑑定及室內生物檢定，篩選出具防治咖啡果小蠹潛力菌株供製劑開發。研究結果顯示，白殭菌於不同咖啡園自然發生率差異頗大，於雲林縣古坑鄉試區 (粗放栽培)，蟲蛀果內咖啡果小蠹雌蟲感染白殭菌比例最高達 13.3% (平均 3.1%)，以 3–6 月為白殭菌盛行期，該期間平均 70.0% 雌蟲死亡個體皆感染白殭菌。於南投縣仁愛鄉試區 (慣行栽培)，白殭菌感染率極低，最高僅 4.9% (平均 0.6%)。潛力菌株篩選上，已自台中市、南投縣及雲林縣等不同產區採集 98 株分離株，並挑選 7 株菌株作為候選菌株，經室內培養形態與 ITS、Bloc 及 EF1 序列分析鑑定後，確認皆屬 *B. bassiana*。各菌株於不同環境溫度下菌絲生長、孢子發芽及對咖啡果小蠹致死能力均存在差異，以分離株 B005、B025 及 B068 較具耐高溫特性，於 32℃下孢子發芽率分別達 98%、94% 及 88%，其他菌株發芽率則介於 30–60%。多數菌株於 25℃下致死能力較佳，接種後第 7 日前即可達 100% 致死率。於 32℃高溫環境下各菌株致死能力明顯下降，於接種後第 8 日前皆無法達 100% 致死率，但仍以分離株 B005、B039 及 B068 表現較佳，第 8 日致死率分別為 67%、72% 及 77%。後續研究將持續菌株篩選，並先行以分離株 B068 等耐高溫菌株進行製劑，希冀未來能開發適合台灣防治咖啡果小蠹的本土白殭菌產品，裨益我國咖啡產業發展。

關鍵詞：咖啡果小蠹、白殭菌、生物防治。

前言

咖啡為世界性重要飲料作物，屬於茜草科 (Rubiaceae) 咖啡屬 (*Coffea*) 植物。咖啡屬物種計有 120 餘種，多為常綠灌木，其中僅阿拉比卡咖啡 (*C. arabica* L., arabica coffee) 與羅布斯塔咖啡 (*C. canephora* Pierre ex A. Froehner, robusta coffee) 主要用於經濟生產並作為飲品 (Davis *et al*. 2006; Guyot *et al*. 2020)。此 2 種咖啡原生於非洲，適合生長於溫暖潮濕的常綠闊葉林 (Davis *et al*. 2006)，故產區多位於南、北回歸線間之熱帶與亞熱帶地區，目前在非洲、亞洲及美洲等全球 80 多個國家的總栽培面積逾 1,000 萬公頃，約為茶葉生產面積之 2 倍 (Food and Agriculture Organization of the United Nations n.d.)。咖啡於台灣種植歷史亦有百年以上，根據農糧署統計資料 (https://agr.afa.gov.tw/afa/afa_frame.jsp)，國產咖啡於 2021 年在台灣之種植面積 1,169 ha，收穫面積 1,142 ha，年收穫量約 900 Mg，年產值近 7 億新台幣，全台栽培面積達 100 ha 以上的主要產區包含屏東縣 (232 ha)、南投縣 (190 ha)、台東縣 (155 ha) 及嘉義縣 (135 ha)。近十多年來台灣咖啡種植量劇增，栽培面積相較於 2011 年 (763 ha) 成長 53%，顯見國內咖啡產業之蓬勃發展。

投稿日期：2023 年 2 月 18 日；接受日期：2023 年 4 月 7 日。
* 通訊作者：hfni@tari.gov.tw
[1] 農業部農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系助理研究員。台灣 嘉義市。
[2] 農業部農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系副研究員兼系主任。台灣 嘉義市。

台灣咖啡生產面臨的病蟲害以咖啡果小蠹 (*Hypothenemus hampei* (Ferrari)) (Coleoptera: Curculionidae) 為最具破壞性之害蟲種類 (Vega *et al*. 2009; Johnson *et al*. 2020)。咖啡果小蠹寄主範圍以咖啡屬植物為主，特別以羅布斯塔咖啡與阿拉比卡咖啡為其在野外或田間之重要寄主 (Vega *et al*. 2012; Vega *et al*. 2019; Vega *et al*. 2020)。此種甲蟲體型細小，雌成蟲體長僅 1.6–1.9 mm，雄成蟲體型又略小於雌蟲 (0.99–1.3 mm) 且後翅退化 (Vega *et al*. 2015a; Vega *et al*. 2015b)。咖啡果小蠹大半生活史於咖啡果實內度過，雌蟲交尾後會伺機找尋其它咖啡果實以產下子代，未熟青果與紅熟果皆是其危害對象 (Damon 2000; Vega *et al*. 2015a; Dufour *et al*. 2021)。雌蟲偏好等待果實乾物重較高時 (開花後 120–150 d)，方於胚乳內鑽蛀隧道並產卵，而幼蟲孵化後隨即蠹蛀胚乳為食 (Baker *et al*. 1992; Ruiz-Cárdenas & Baker 2010)。此般危害直接影響咖啡產量與品質，亦會導致落果，甚至增加果實受微生物汙染之風險 (Damon 2000; Rezende & Taniwaki 2020)。咖啡果小蠹原產於非洲 (Vega *et al*. 2019)，因全球咖啡產業愈趨興盛，該蟲亦隨之擴散各地，目前多數咖啡產區皆遭其入侵，近年來於夏威夷 (2010 年)、巴布亞新紐內亞 (2017 年) 及中國 (2020 年) 等地亦仍持續有新入侵紀錄傳出 (Johnson *et al*. 2020; Sun *et al*. 2020)，台灣則首次於 2007 年發現其蹤跡 (Lin *et al*. 2010)。咖啡果小蠹的出現對各國咖啡產業著實為一大打擊，例如於此蟲入侵夏威夷之初期 (2011–2013 年)，即造成當地每年 1,010–1,560 萬美元經濟損失；在巴西，每年因此蟲害所致的損失更高達 2,150–3,580 萬美元 (Oliveira *et al*. 2012; Leung *et al*. 2014; Johnson *et al*. 2020)。

受限於咖啡果小蠹藏匿於咖啡果實內的生態習性 (Damon 2000; Vega *et al*. 2015a)，若僅仰賴施用化學殺蟲劑則防治效果不盡理想，亦非長久之計 (Villalba-Gault *et al*. 1995; Johnson *et al*. 2020)，因此夏威夷與哥倫比亞等國已開始導入整合性害物管理 (integrated pest management; IPM) 於咖啡生產，結合蟲害監測、化學殺蟲劑、生物性資材施用及耕作防治等技術，有效降低蟲害發生 (Aristizábal *et al*. 2012; Aristizábal *et al*. 2016; Johnson *et al*. 2020)。各項防治技術中，除落實田間衛生 (sanitation) 極其重要外 (Aristizábal *et al*. 2011; Aristizábal *et al*. 2017; Cure *et al*. 2020; Kawabata *et al*. 2020)，生物防治更是相當關鍵的一環，並被視為替代化學防治之有效策略 (Benavides *et al*. 2012)。目前已知數種捕食或寄生咖啡果小蠹之昆蟲、線蟲及真菌等天敵 (Damon 2000; Vega *et al*. 2015a; Escobar-Ramírez *et al*. 2019)，其中又以巴氏蠶白殭菌 ((*Beauveria bassiana*) (Bals.-Criv.) Vuill.) (簡稱白殭菌) 最常被運用於防治咖啡果小蠹，亦具有不少商品化製劑 (de Faria & Wraight 2007; Aristizábal *et al*. 2016; Mascarin & Jaronski 2016; Aristizábal *et al*. 2017; Mariño *et al*. 2017)。

白殭菌為蟲生真菌 (entomopathogenic fungi)，屬於子囊菌門 (Ascomycota)，肉座菌目 (Hypocreales) 之蟲草科 (Cordycipitaceae)，已知寄主範圍含括 700 種以上昆蟲綱 (Insecta) 與蜱蟎亞綱 (Acari) 等節肢動物 (Zimmermann 2007)。此真菌普遍存在受咖啡果小蠹危害的咖啡果園，在不同國家、田區、季節及環境之白殭菌，對咖啡果小蠹自然感染程度差距甚大 (Monzón *et al*. 2008; Vega *et al*. 2009; Wraight *et al*. 2018)，Góngora *et al*. (2009) 指出在哥倫比亞田間的白殭菌自然發生率約為 10%；與多數真菌相同，高濕環境有助白殭菌侵染蟲體 (Pell *et al*. 2010; Vera *et al*. 2011)，故在遮陰樹下施用白殭菌有利於防治咖啡果小蠹 (Aristizábal *et al*. 2016)；若將白殭菌孢子懸浮液施灑於地面上咖啡落果，亦能造成咖啡樹上 30–50% 咖啡果小蠹感染白殭菌，並降低 50% 以上咖啡果小蠹侵染率 (Bustillo *et al*. 1999; Vera *et al*. 2011)；同時，施用時機亦是白殭菌防治成功與否的關鍵，若田間咖啡果小蠹已嚴重發生 (侵染率逾 12.6%) 且無搭配清園，則即使連續每月施用白殭菌並無法有效控制此蟲害之發生 (Woodill *et al*. 2017)。Hollingsworth *et al*. (2020) 建議白殭菌施用時機應視咖啡果小蠹防治基準而定，如此施藥方符合經濟效益且達防治效果。

隨著國內咖啡產業持續發展，咖啡果小蠹危害狀況亦日趨嚴重，各產區多遭其肆虐。台灣現行尚無登記防治此害蟲之化學殺蟲劑或微生物農藥等資材，目前雖有推廣懸掛咖啡果小蠹誘蟲器，但礙於陷阱誘捕蟲數有限，大規模吊掛又需耗費較高成本與人力，故目前主要以落實田間衛生為減少蟲害之防治方法。借鏡夏威夷與哥倫比亞等國經驗，白殭菌為有效且環境友善之防治資材，故本團隊著手於本土白殭菌防治咖啡果小蠹之相關研究，試圖解決當前蟲害管理上的困境，以提升國產咖啡品質。本研究除調查本土白殭菌於咖啡園的自然感染率，同時採集與鑑定各地白殭菌菌株，並進一步評估不同溫度下各分離株之菌絲生長、孢子發芽及對咖啡果小蠹室內病原性的差異，以篩選具潛力分離株作為後續生物製劑開發與白殭菌田間施用方法之基礎。

材料與方法

咖啡果小蠹田間自然感染白殭菌之調查

本研究自 2021 年 3 月至同年 12 月，進行田間白殭菌於咖啡果小蠹自然發生率調查。調查咖啡園樣區位於南投縣仁愛鄉 (海拔約 675 m) 與雲林縣古坑鄉 (海拔約 400 m)，園內栽培品種均為阿拉比卡咖啡 (*C. arabica*)。兩處果園皆有咖啡果小蠹發生，仁愛試區為慣行防治區，於 2021 年 2 至 7 月共計施用 7 次化學藥劑，古坑試區則無施用化學農藥。白殭菌調查之取樣方式參考 Bustillo *et al*. (1998) 所建立之 30 棵樹取樣法 (30-tree sampling method)，自果園隨機選定 30 棵咖啡樹，每株隨機取樣 3 顆遭受咖啡果小蠹危害未熟果 (green berry)，果實經解剖後以鏡檢方式觀察果實內部雌蟲存活或死亡狀況 (子代不計)，疑似感染白殭菌死亡個體則依照本文下列方法進行病原分離，待確認菌種後予以紀錄。本調查每 2 wk 進行 1 次。調查數據轉換為咖啡果小蠹死亡率 (死亡蟲數/總蟲數) 與白殭菌感染率 (感染白殭菌蟲數/總蟲數)。

白殭菌之分離與保存

本研究自台南市東山區、雲林縣古坑鄉、南投縣仁愛鄉、嘉義縣竹崎鄉及台中市東勢區咖啡園內，自蟲蛀果之疑似感染白殭菌蟲體進行真菌分離。分離方式係將染菌蟲體以雙面膠黏貼於培養基之培養皿上蓋內側，蟲體上所生成之分生孢子自然落於含有 300 mg L^{-1} 鏈黴素 (streptomycin) 與 50 mg L^{-1} 四環黴素 (tetracycline) 之 PDA (potato dextrose agar) 培養基 (Difco, Franklin Lakes, NJ, USA) 上。待孢子長出菌絲後，切取菌絲尖端並培養於另一 PDA 培養基，於 25℃培養 14 d，再於產孢後進行單孢分離，所得菌株經編號並切取菌絲塊保存於無菌水，另將分生孢子保存於 26.4% 甘油溶液並保存於 -20℃冰箱。

本研究所收集之菌株，依據分離株採集地點與菌落培養形態差異，挑選 7 株由咖啡果小蠹分離之白殭菌分離株，菌株編號分別為 B005 (台南東原區分離株)、B015 (雲林古坑鄉分離株)、B025 (南投仁愛鄉分離)、B039 (嘉義竹崎鄉分離)、B045 (雲林古坑鄉分離株)、B068 (台中東勢區分離株) 及 B070 (台中東勢區分離株)，另使用保存於農業部農業試驗所嘉義農業試驗分所植物病害管理研究室由甘藷蟻象分離之白殭菌 B001 菌株，以及由荔枝椿象所分離之白殭菌 B098 與 B102 菌株，作為不同寄主來源共同比較之菌株，以上共 10 株白殭菌菌株一併進行以下各項試驗。

白殭菌之形態與分子鑑定

白殭菌分離株培養於含 1% 酵母抽出物 (yeast extract; Gibco™, Billings, MT, USA) 之 SDYA (Sabouraud dextrose agar with yeast extract; SDAY, NeoGen, Lansing, MI, USA)，於 25℃定溫箱中黑暗培養 14 d，觀察並拍攝菌落形態。為能清楚觀察白殭菌產孢結構，另於 2% WA (water agar) 培養基上置入 1 片 22 mm × 22 mm 大小已消毒過之蓋玻片，蓋玻片上再放上 PDA 培養基塊 (約 5 mm × 5 mm)，將測試菌株之孢子懸浮液 10 µL 接種於此 PDA 培養基塊後，於上方再覆蓋上 1 無菌蓋玻片 (22 mm × 22 mm)，置於 25℃培養 5 d 後，將上方蓋玻片取下，置於含 10 µL 0.02 % Tween 20 (Sigma-Aldrich, Singapore) 水溶液之載玻片上，以干涉位像差 (differential interference contrast;

DIC) 顯微鏡 (Nikon Ni, Nikon, Tokyo, Japan) 進行觀察，並以 Gryphax 軟體 (Gryphax Naos, Jenoptik, Jena, Germany) 拍攝產孢構造及量測 50 個以上之分生孢子大小。

為進一步以核酸分析確認本研究所分離之白殭菌種類，將測試菌株培養於 PDA 培養基，待長出足量菌絲後，刮取少量菌絲，置於 50 μL Magic quick seed extract solution (Bio-Genesis, Taipei, Taiwan)，以 65℃/6 min 與 95℃/2 min 處理後，作為 PCR (polymerase chain reaction) 之 DNA 模板。本試驗所使用之 PCR 溶液包含 5× PCR 緩衝液 (Fast-Run Taq Master Mix) (Protech Technology Enterprise, Taipei, Taiwan) 與 0.5 μM primer，並以無菌水將總體積調整至 25 μL。所使用引子對共 3 組，分別為增幅 ITS (internal transcribed spacer) 序列之 ITS4 (5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′) 與 ITS5 (5′-GGAAGTAAAAGTCGTAAC-AAGG-3′) (White *et al*. 1990)，增幅 Bloc (B locus intergenic region) 序列之 B5-1F (5′-CGA-CCCGGCCAACTACTTTGA-3′) 與 B3-1R (5′-GT-CTTCCAGTACCACTACGCC-3′) (Rehner *et al*. 2006)，以及增幅 EF1-α (translation elongation factor 1-α) 序列之 EF1-983F (5′-GCYCCYGG-HCAYCGTGAYTTYAT-3′) 與 EF1-2218R (5′-ATGACACCRACRGCRACRGTYTG-3′) (Rehner & Buckley 2005)。其中，ITS 序列增幅反應條件為：94℃反應 4 min，1 次循環；94℃反應 30 s、54℃反應 30 s、72℃反應 45 s，33 次循環；最後 72℃反應 7 min，1 次循環。Bloc 與 EF1-α 序列增幅條件除引子黏合 (annealing) 階段調整為 36 次循環外，其餘溫度、時間及循環數均與 ITS 增幅條件相同。所得 PCR 產物以 1.5% agarose gel 與 0.5× TBE 緩衝液進行核酸電泳分析，確認 PCR 增幅產物為單一明顯條帶後，產物委託源資生物科技公司 (Tri-I Biotech Inc., Taipei, Taiwan) 進行核酸定序。其中，Bloc 序列由於長度較長，增加使用 B22U (5′-GTCGCAGCCAGAGCAACT-3′)、BRint (5′-AGCATATCGGGCATGACT-GAB822L-3′) 及 B822L (5′-AGATTCGCAACGT-CAACTT-3′) 進行定序 (Rehner *et al*. 2006)。定序後之核酸序列利用美國國家生物科技資訊中心 (National Center for Biotechnology Information; NCBI) 基因資料庫進行序列查詢與比對。

白殭菌分離株之親緣關係樹重建

親緣關係樹重建參考 Khonsanit *et al*. (2020) 進行 *Beauveria* 種類分群所使用部分菌株之 ITS、Bloc 及 EF1 序列，將各菌株之序列由 GenBank 資料庫下載後，與本研究菌株之基因序列進行比較 (附錄)。各基因片段先以 ClustalX2 軟體 (Larkin *et al*. 2007) 進行相似度排列 (alignment) 後，以 jModeltest 進行 DNA 替換模型 (DNA substitution model) 最佳化預測 (Darriba *et al*. 2012)，採用貝氏資訊準則方法 (Bayesian information criterion) 分析得到之 DNA 替換模型，套用於演化樹之建構。以 SequenceMatrix v.1.8 軟體 (Vaidya *et al*. 2011) 拼接各基因序列，並以 MrBayes v.3.2.6 (Ronquist *et al*. 2012) 進行貝氏演算 (Bayesian inference) 之樹型建構。用於 ITS、Bloc 及 EF1 的 DNA 替換模型分別為 GTR + I + G、HKY + G 及 GTR + G。共進行 2 次分析，每次分析 1×10^7 個世代 (generation)，每 10,000 個世代取 1 棵分析，為求分析準確，捨棄前 25% 世代。

不同溫度對白殭菌菌絲生長與孢子發芽之影響

供試菌株之孢子懸浮液均勻塗抹於 PDA 培養 2 d 後，以直徑 5 mm 打孔器切取菌絲塊，並接種至另一個 SDAY 培養基中央，培養基於定溫箱中黑暗培養，處理溫度分別為 15、20、25、30、32 及 34℃。培養 14 d 後，測量菌落直徑，並換算為菌絲每日周徑生長速率 (mm d^{-1})。每處理 5 重複，試驗重複 2 次。為觀察溫度對測試菌株孢子發芽之影響，另將供試菌株培養於 PDA 培養基 14 d 後，以 0.02% Tween 20 水溶液將分生孢子懸浮，並以血球計數器計算後調整孢子濃度至 1×10^6 conidia mL^{-1}。將 50 μL 孢子懸浮液以 L 型玻璃棒均勻塗抹在 PDA 培養基上後，將培養基置於定溫箱黑暗培養，處理溫度分別為 15、20、25、30、32 及 34℃。培養 24 h 後，以解剖顯微鏡 (Nikon SMA 1500, Nikon, Tokyo, Japan) 觀察

每皿培養基中分生孢子發芽情形，發芽管長度大於孢子寬度的 2 倍則記為發芽，並計算每百顆孢子發芽率。每處理 4 重複，試驗重複 2 次。

白殭菌對咖啡果小蠹雌蟲之致病力

供試昆蟲

咖啡果小蠹以人工飼料大量飼養，飼料配方參考 Vega *et al*. (2011)，以 20 mL 玻璃管為飼料容器，每管添加 6 mL 飼料。飼養環境條件為定溫 27 ± 1℃，85 ± 5% 相對溼度 (relative humidity; RH)，無光源。初始蟲源採集自雲林縣古坑鄉咖啡園，雌蟲經次氯酸鈉稀釋液消毒後，置於含人工飼料之玻璃管，玻璃管口再以滅菌棉花塞住以防汙染。

生物檢定

供試菌株以 PDA 培養 2 wk，將分生孢子以 0.02% Tween 20 水溶液配製為孢子懸浮液 (1×10^7 conidia mL^{-1})。在直徑 6 cm 培養皿內放入直徑 5.5 cm 無菌圓形濾紙，再將 200 μL 孢子懸浮液滴於濾紙上，再於培養皿中放入 10 隻人工飼養咖啡果小蠹雌蟲，於 25 或 32℃ 定溫箱全暗環境飼養。自試驗首日起，每日觀察並記錄咖啡果小蠹存活狀況，死亡蟲體則取出並個別置於 1.5 mL 離心管，以確認蟲體後續是否產生白殭菌孢子，每處理共 6 重複。另以 200 μL 0.02% Tween 20 水溶液替代孢子懸浮液作為對照處理。

統計分析

試驗數據分析透過 RStudio (ver. 2022.07.2 Build 576) 執行。為檢定「溫度」與「菌株」因子，對菌絲生長速率與孢子發芽之影響，先將試驗數據套用於廣義線性模型 (generalized linear model; GLM)，採二項式分布 (binomial distribution)，由似然比檢定 (likelihood-ratio test) 分析因子顯著性。若因子具顯著影響力，則以相同方式檢定單一溫度下「菌株」因子顯著性，若菌株間存在顯著差異，再經 Tukey's honestly significant difference test (Tukey's HSD test) 進行事後檢定，比較各菌株間差異 (Tukey's HSD test 經由 "emmeans" 套件執行)。白殭菌致病力評估試驗數據以存活分析 (survival analysis) 處理，將雌蟲每日存活數據以 Kaplan-Meier 法 (Kaplan-Meier method) 建構存活曲線模型，再檢定「菌株」因子對於存活曲線之影響力 (survival analysis 相關函數經由 "survival" 套件執行)，對照組數據不列入統計。若檢定結果顯著則進一步以 Tukey's HSD test 比較各菌株間存活曲線之差異。上述檢定顯著水準皆訂為 0.05 ($\alpha = 0.05$)。

結果

白殭菌田間自然發生率調查

田間咖啡果小蠹死亡率與白殭菌感染咖啡果小蠹之自然發生率如圖 1 所示。於雲林古坑試區，咖啡蟲蛀果內咖啡果小蠹雌蟲之死亡率 2.2–33.3% (平均 11.6%)，雌蟲死亡個體中感染白殭菌之比例 0.0–13.3% (平均 3.1%)，整體上占雌蟲死亡率之 27.1%，又以 3–6 月為白殭菌盛行期 (感染率 3.3–13.3%)，該期間平均 70.0% 雌蟲死亡個體皆感染白殭菌，而自 7 月後白殭菌感染情形逐漸減少，8 月與 11–12 月未見染菌蟲體，僅 9–10 月觀察到零星感染個體。於南投仁愛試區，咖啡果小蠹死亡率介於 12.2–84.4% (平均 50.9%)，雌蟲感染白殭菌比例介於 0.0–4.9% (平均 0.6%)，僅 4–5 月與 11–12 月可見少量白殭菌自然感染情形。

白殭菌之分離與鑑定

本研究由各地咖啡園採集之染病咖啡果小蠹蟲體共分離 98 株白殭菌分離株，挑選其中 7 株並與由甘藷蟻象與荔枝椿象所分離之 3 株白殭菌共同進行培養形態觀察。結果顯示所測試的 10 株白殭菌分離株，培養於 SDAY 培養基上生長均緩慢，菌落表面呈綿毛狀，為白色至淡黃色，培養基背面則各菌株間均呈不同深淺的黃色 (圖 2)。其分生孢子均為球形或橢圓形，經顯微鏡以 1,000× 觀察測量分離株 B015、B025、B039、B068、B070 及 B102 之分生孢子大小，分別為 2.55 ± 0.05 μm × 2.19 ± 0.04 μm、2.64 ± 0.05 μm × 2.38 ± 0.04 μm、2.26 ± 0.03 μm × 1.92 ± 0.03 μm、2.47 ± 0.03 μm × 2.16 ± 0.03 μm、2.71 ± 0.03 μm × 2.35 ± 0.03 μm 及 2.33 ± 0.04 μm × 1.96 ± 0.03

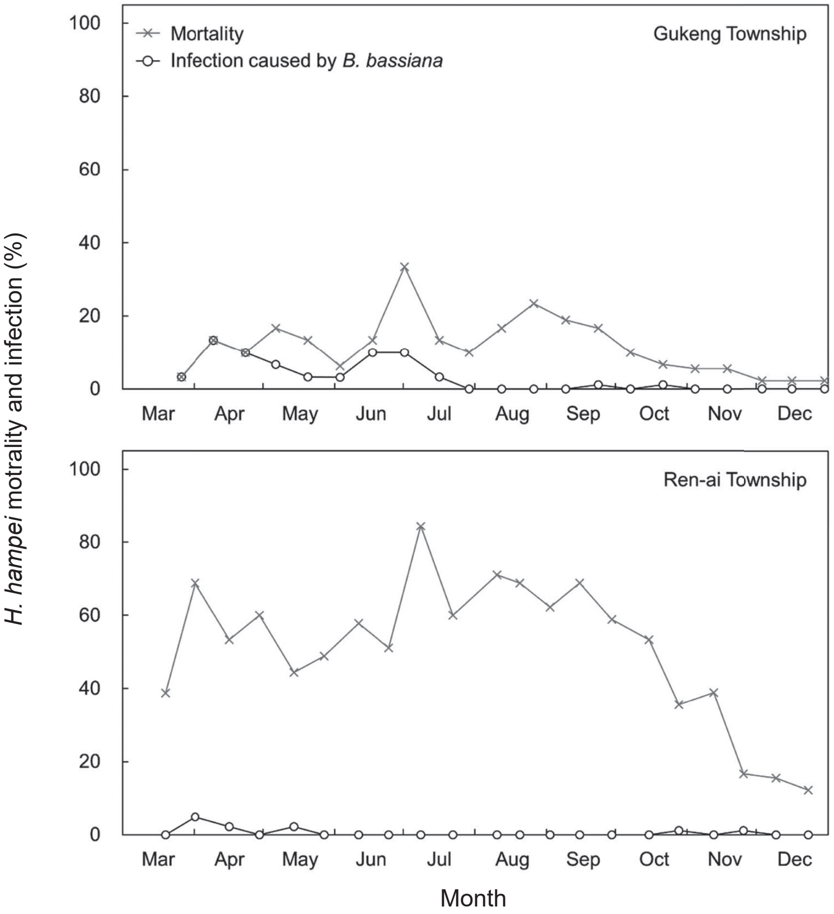


圖 1. 田間咖啡果小蠹死亡率與白殭菌感染率之變化。

Fig. 1. The mortality of *Hypothenemus hampei* and the infection rate by *Beauveria bassiana* in the field.

μm。分生孢子梗無隔膜，產孢細胞呈短球狀或長頸瓶狀 (圖 3)。

分子生物學鑑定與親緣關係

白殭菌分離株以 ITS、EF1-α 及 Bloc 專一性引子對增幅後，其增幅片段大小分別約為 593、1,000 及 1,500 bp，透過此 3 個基因序列重建之親緣關係樹如圖 4 所示。7 株分離自咖啡果小蠹菌株、3 株分離自甘藷蟻象及荔枝椿象菌株，皆被歸類於 *B. bassiana* 分支 (clade)，貝氏分析事後機率值 (Bayesian posterior probability) 為 100%。再按序列差異性，10 株分離株可歸於 3 個不同小分支，7 株自咖啡果小蠹分離菌株與 1 株自甘藷蟻象分離菌株分屬於 2 個小分支，另分離自荔枝椿象菌株 B098 與 B102 則獨立於其它供試菌株。

不同溫度下菌絲生長速率與孢子活性

不同溫度下白殭菌分離株菌絲生長速率如表 1 所示。除了分離株 B025、B098 及 B102 以 25℃為菌絲生長較佳溫度外，其餘菌株之菌絲生長率均以 30℃為生長最佳溫度。於 25℃培養下，所有測試菌株每日菌絲生長率介於 2.39–3.37 mm，其中分離株 B025 生長速率 3.37 mm d^{-1} 顯著高於其它菌株。而於 30℃培養下，除了分離株 B025 菌絲生長速率略為降低至 3.23 mm d^{-1} 以及分離株 B098 與 B102 顯著降低至 1.60 mm d^{-1} 與 1.51 mm d^{-1} 外，其餘

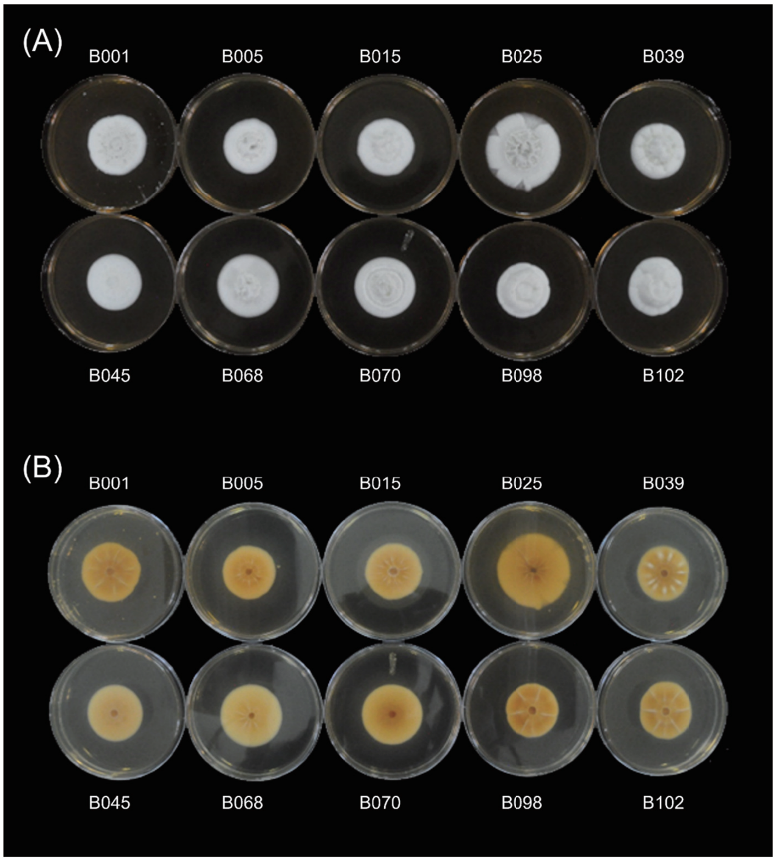


圖 2. 白殭菌分離株培養於 SDAY 培養基上 14 d (25℃) 之菌落形態。(A) 正面與 (B) 背面。

Fig. 2. Colony morphology of the *Beauveria bassiana* isolates cultured on Sabouraud dextrose agar with yeast extract for 14 d. (A) top view and (B) reserve view.

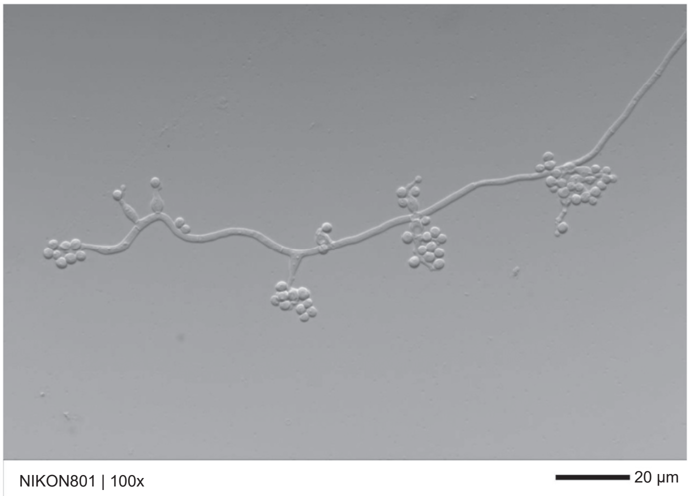


圖 3. 白殭菌分離株 B068 之分生孢子梗與分生孢子 (比例尺 = 20 μm)。

Fig. 3. The conidiogenous structures and the conidia of *Beauveria bassiana* isolate B068 (bar = 20 μm).

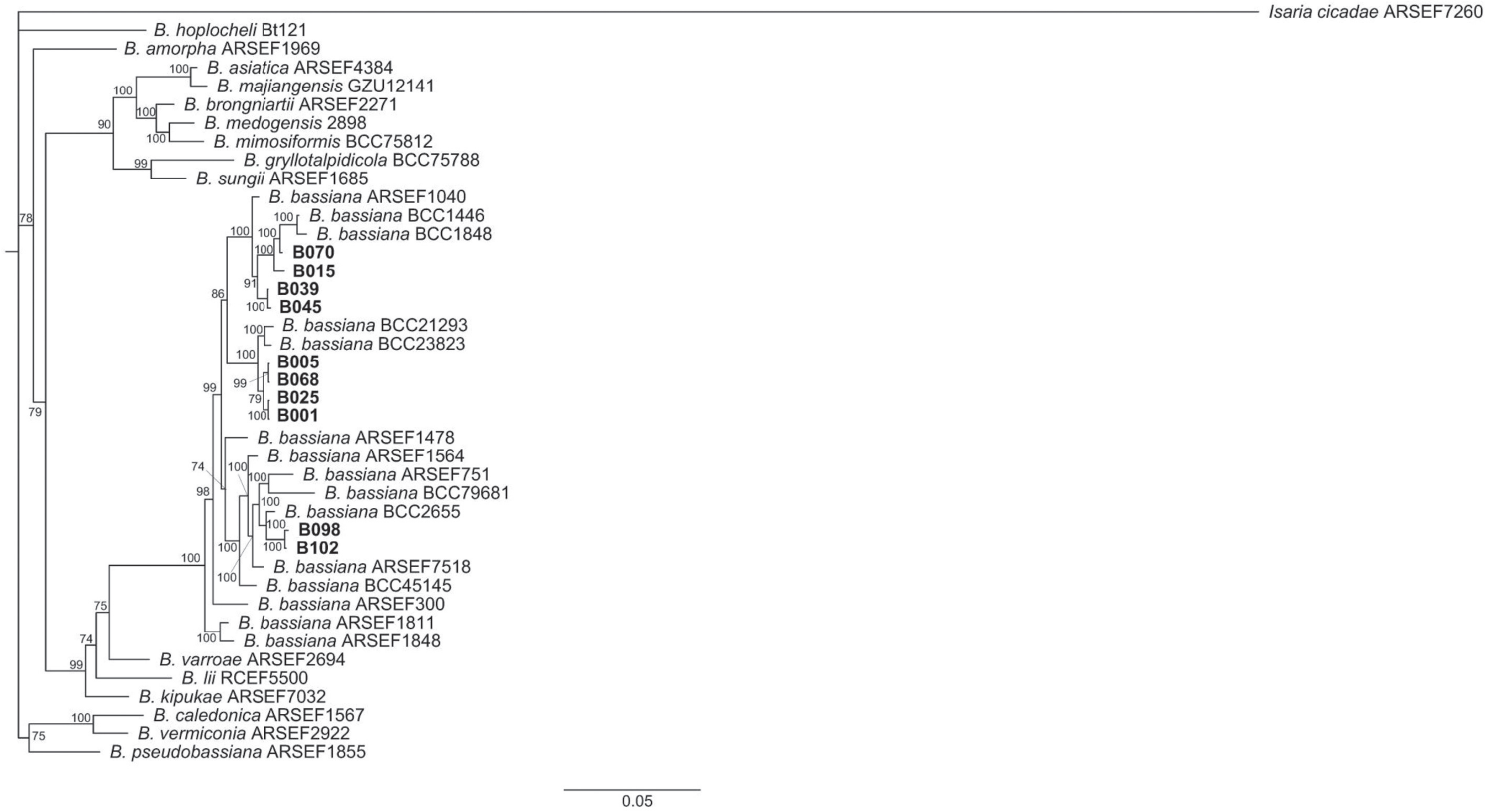


圖 4. 使用 ITS、EF1-α 及 Bloc 序列對本研究與 GenBank 資料庫之 *Beauveria* 菌株以貝氏演算法進行多基因類緣分析之結果。節點之數字表示貝氏分析之事後機率值。使用 *Isaria cicadae* ARSEF7260 之序列作為外群。本研究試驗之菌株以粗體字顯示。

Fig. 4. The Bayesian phylogenetic tree of *Beauveria* isolates from this study and GenBank database. The phylogenetic tree was built using concatenated sequences of partial internal transcribed spacer, translational elongation factor 1-α, and B locus. The Bayesian posterior probabilities are indicated next to the nodes. The tree is rooted by *Isaria cicadae* ARSEF7260. Isolates from this study are emphasized in bold.

表 1. 白殭菌分離株於不同溫度下之菌絲生長速率。
Table 1. Mycelial radial growth rate of *Beauveria bassiana* isolates.

Isolate	Mycelial growth rate (mm d^{-1})					
	15℃	20℃	25℃	30℃	32℃	34℃
B001	1.55 f[z]	2.08 bcd	2.64 ab	2.81 c	2.06 de	0.76 bc
B005	1.26 abc	1.91 ab	2.39 a	2.52 b	1.82 c	0.93 de
B015	1.19 ab	1.91 abc	2.51 ab	3.05 d	2.13 ef	0.80 cd
B025	1.32 cd	2.09 cd	3.37 c	3.23 e	2.06 de	0.63 b
B039	1.16 a	1.86 a	2.59 ab	2.99 d	2.24 f	1.03 e
B045	1.19 ab	2.11 d	2.65 ab	3.09 d	2.14 ef	0.71 bc
B068	1.32 cd	2.15 de	2.81 b	2.99 d	1.99 d	0.97 e
B070	1.29 bc	2.11 d	2.41 a	2.78 c	0.99 b	0.00 a
B098	1.51 ef	2.24 de	2.50 ab	1.60 a	0.41 a	0.00 a
B102	1.41 de	2.30 e	2.63 ab	1.51 a	0.50 a	0.00 a

[z] Values within a column followed by the same letter are not significantly different by Tukey's HSD test at 5% level.

菌株於 30℃培養時，其菌絲生長速率均較 25℃快速，約為 2.52–3.09 mm d^{-1}。而所有測試菌株於 32℃培養下，其菌絲生長速率均低於 30℃之培養；於 34℃培養時，分離株 B070、B098 及 B102 之菌絲完全無法生長，其餘分離株菌絲生長速率亦僅 0.63–1.03 mm d^{-1}。

不同溫度下白殭菌分離株孢子發芽率如表 2 所示。於 15℃環境下，除了分離株 B102 有 69.8% 的孢子發芽率，其餘菌株的發芽率均介於 0.0–39.8%。於 20℃時，分離株 B005、B025 及 B102 孢子發芽率分別為 84.5%、87.5% 及 91.3%，明顯高於其它菌株外，其餘測試菌株的發芽率介於 54.0–80.5%。於 25 與 30℃，所有測試菌株均可達 90% 以上的發芽率，各菌株之間無顯著差異，然於 32℃下，除了分離株 B005 與 B025 仍可維持 90% 以上的發芽率外，其餘菌株發芽率介於 12.8–87.8%，均明顯低於 30℃處理之孢子發芽率，其中分離株 B102 孢子發芽率下降幅度最大，發芽率 12.8%。於 34℃下則除了分離株 B005 與 B068 分別有 14.5% 與 7.3% 的極低發芽率外，其餘菌株之分生孢子已完全不發芽。

白殭菌對咖啡果小蠹之室內致病力評估

白殭菌分離株室內致病力評估結果如圖 5 所示。試驗對照處理雌蟲於 25℃與 32℃下皆未死亡。於環境溫度 25℃下，分離自咖啡果小蠹菌株對於此蟲雌蟲皆有良好的致病力，接種後第 6 日可造成半數以上雌蟲死亡 (平均死亡率 58.3–78.3%)，接種後第 7 日雌蟲平均死亡率達 96.7–100.0%，惟對照菌株 B098 與 B102 的致病力較差，雌蟲於第 7 日死亡率僅 41.7–70.0%。統計分析結果顯示，咖啡果小蠹雌蟲於接種不同白殭菌分離株之每日存活曲線間存在顯著差異 (P < 0.05)，接種分離自咖啡果小蠹菌株 (B005、B015、B025、B039、B045、B068 及 B070) 雌蟲存活率較低，顯著低於接種對照菌株者 (B098與B102) (P < 0.05)，但與對照菌株 B001 間無顯著差異。7 支菌株間以分離株 B005 表現的存活率顯著低於分離株 B015，其餘菌株兩兩間無顯著差異。另於環境溫度 32℃下，依據 10 支菌株於第 8 日的致病力表現，以分離株B068致病力表現最佳，分離株 B039 次之 (平均死亡率分別為 76.7% 與 71.7%)，而以分離株 B102 表現最差 (平均死亡率為 8.3%)，其餘菌株所造成之死亡率則介於 11.7–66.7%。統計分析結果顯示，菌株差異對於寄主存活表現具顯著影響 (P < 0.05)。不同菌株於寄主存活表現以接種分離株 B068 的雌蟲存活率顯著低於分離株 B015、B045、B098 及 B102，而分離株 B005 與 B039 皆與分離株 B015、B045 及 B102 具顯著差異，其餘比較結果則如圖 5 所示。

表 2. 溫度對白殭菌分離株孢子發芽之影響。

Table 2. Effect of temperature on the spore germination rate (%) of *Beauveria bassiana* isolates.

Isolate	Spore germination rate (%)[z]					
	15℃	20℃	25℃	30℃	32℃	34℃
B001	0.0 a[y]	54.0 a	97.0 ab	96.3 bcd	80.8 f	0.0 a
B005	39.8 d	84.5 efg	97.8 ab	98.5 d	98.0 g	14.5 c
B015	0.0 a	67.8 bc	95.0 a	94.0 abc	48.0 cd	0.0 a
B025	17.5 c	87.5 fg	99.5 b	98.8 d	94.3 g	0.0 a
B039	7.3 b	64.8 ab	95.3 a	90.5 a	51.3 de	0.0 a
B045	0.0 a	76.3 cde	94.8 a	93.3 ab	32.0 b	0.0 a
B068	10.3 bc	80.5 def	99.5 b	98.0 cd	87.8 f	7.3 b
B070	34.3 d	74.3 bcd	98.5 ab	96.3 bcd	39.3 bc	0.0 a
B098	13.5 bc	78.0 de	98.5 ab	95.8 abcd	59.5 e	0.0 a
B102	69.8 e	91.3 g	96.8 ab	93.3 ab	12.8 a	0.0 a

[z] Spore germination rate (%) = No. of germinating spores on potato dextrose agar/100 spores.
[y] Values within a column followed by the same letter are not significantly different by Tukey's HSD test at 5% level.

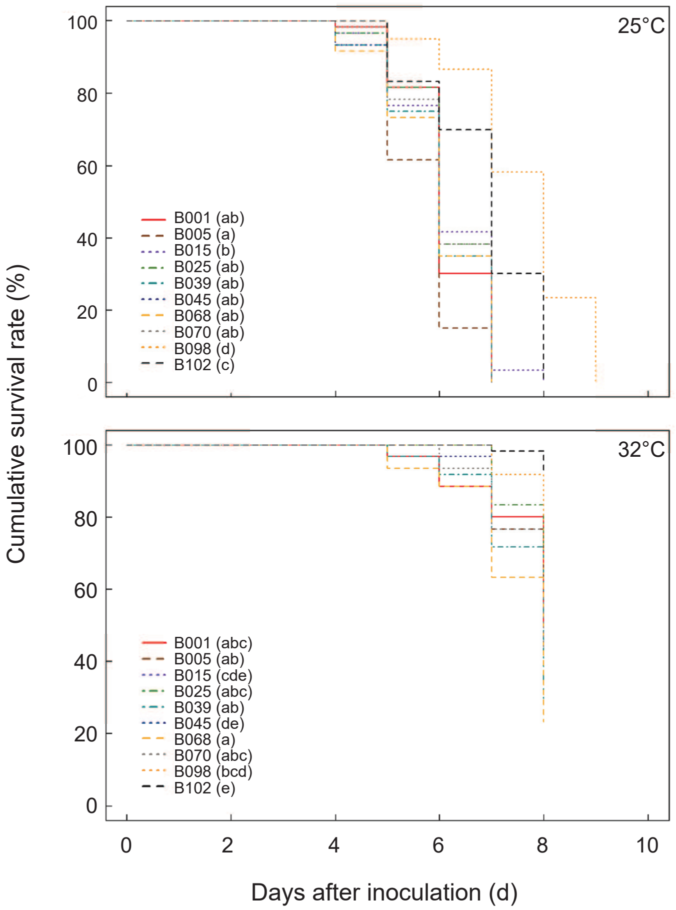


圖 5. 25℃與32℃下咖啡果小蠹雌蟲接種不同白殭菌分離株之累積存活率。

Fig. 5. Cumulative survival rate of *Hypothenemus hampei* females inoculated with different isolates of *Beauveria bassiana* at 25℃ and 32℃.

討論

透過本研究於台灣多處咖啡果園之調查，顯示國內許多咖啡產區皆有自然發生白殭菌族群，惟白殭菌盛行率隨地理環境與田間管理模式等因素而有所不同。國內過往未曾有針對咖啡果小蠹調查白殭菌田間自然發生率之研究報告，而根據本研究於 2021 年之調查，古坑試區白殭菌感染咖啡果小蠹雌蟲最高達 13.3%，而仁愛試區感染率最高僅 4.9%。按 Vega *et al*. (2015a) 回顧各國白殭菌於咖啡果小蠹最高感染率紀錄，不同地區白殭菌感染率變化甚大，於喀麥隆的田間感染率高達 71%，在尼加拉瓜、哥倫比亞及厄瓜多的感染率則介於 30–44%，在巴西與波多黎各的感染率皆小於 1%。事實上，白殭菌易受溫度、濕度及光照量等環境因子所影響 (Inglis *et al*. 2001; Staver *et al*. 2001; Pell *et al*. 2010; Vera *et al*. 2011; Mascarin & Jaronski 2016)，以至於各地白殭菌自然發生率不盡相同。許多文獻皆指出涼爽、高濕及低日照遮陰環境適合白殭菌的發生 (Damon 2000; Sanchez *et al*. 2013; Wraight *et al*. 2021)，但亦有少數研究並未觀察到白殭菌感染率與溫濕度等環境因子的相關性 (De La Rosa *et al*. 2000; Monzón *et al*. 2008)。另有研究報告指出，不同海拔 (約 100–700 m) 咖啡園之白殭菌感染率具差異，白殭菌自然感染率隨海拔上升而增加 (Greco *et al*. 2018; Wraight *et al*. 2018)。

本研究於咖啡產季前期 (3–6 月)，在兩試區所調查咖啡果小蠹死亡率與白殭菌自然發生率具明顯差異。古坑試區因未施用殺蟲劑，故雌蟲死亡率較低，此與前人研究相似 (Aristizábal *et al*. 2017; Greco *et al*. 2018)。該期間白殭菌感染率變化介於 3.3–13.3%，接近 Greco *et al*. (2018) 在夏威夷調查之白殭菌自然發生率 (2.3–23.0%)。而在仁愛試區呈現高死亡率與低感染率，該田間由於定期施藥防治害蟲，故導致咖啡果小蠹死亡率偏高。另造成白殭菌自然發生率較低的原因，除前段提及之溫度與濕度等環境因子差異外，藥劑施用與否亦為關鍵因素。如常見的鋅錳乃浦與氧化銅等殺菌劑，即對白殭菌的菌絲生長或孢子發芽具有抑制作用 (Kouassi *et al*. 2003; Roberti *et al*. 2017)。Kouassi *et al*. (2003) 曾以美國牧草盲蝽 (*Lygus lineolaris* (Palisot de Beauvois)) 測試混用殺菌劑對白殭菌感染力的影響，研究顯示於白殭菌施用前 2–4 d 以殺菌劑先行處理盲蝽，白殭菌感染率則顯著降低，同時施用白殭菌與殺菌劑亦對白殭菌感染率具負面影響。除此，某些殺蟲劑與殺草劑市售商品於一定濃度下，亦會對白殭菌侵染造成負面影響 (Usha *et al*. 2014; Celar & Kos 2016)。因此，未來若同時施用白殭菌與其它農藥時，應考量該些藥劑對白殭菌的影響，以避免影響白殭菌於田間殺蟲效果 (Kawabata *et al*. 2020)。

據本研究調查結果，白殭菌田間發生時期以 3–6 月為主，此時相對應之咖啡物候期為小果至中果期，按本團隊於台灣幾處咖啡產區 (古坑鄉與仁愛鄉等) 調查結果 (未發表資料)，此時亦為國內咖啡果小蠹開始危害咖啡果的主要時間點。一般於咖啡果小蠹危害初期，由於雌蟲仍位於蛀孔附近而尚未蛀入深處，故此時蟲體較易受白殭菌感染 (Greco *et al*. 2018)。相似的發現亦見於 Wraight *et al*. (2018) 之研究，該篇作者指出於夏威夷之咖啡產季初期，可在某些園區觀察到相當高的白殭菌自然感染率；儘管如此，該些園區果實蟲蛀率仍逾當地建議防治基準，顯示無法單獨仰賴田間白殭菌族群有效地抑制害蟲發生。因此，額外施用白殭菌仍為咖啡果小蠹防治策略中的重要一環。關於白殭菌施用時機，夏威夷當地建議在咖啡產季前期視蟲害發生狀況施用白殭菌，在果實蟲蛀率尚未超過 3%，且 25% 以上雌蟲仍未蛀入咖啡胚乳 (咖啡豆) 之時為較佳的時間點 (Hollingsworth *et al*. 2020)。故未來台灣也應建立適用本土咖啡產業之防治基準，以作為白殭菌一類防治資材使用時機之依據。

由於白殭菌屬的分生孢子形態具有重疊性，導致該屬缺乏精確可供辨識種間的形態特徵，因此在種的鑑定上仍需以核酸分析進行。本研究所測試 10 個白殭菌菌株經序列分析後均為 *B. bassiana*，但其中仍可分出 3 個小分支，7 個從咖啡果小蠹分離之菌株在分支上顯然並無地理來源之相關性，而從親緣關係圖顯示荔枝椿象分離菌株歸在一個不同於咖啡果小蠹分離株的小分支，此差異性是否與白殭菌分

離寄主來源不同有關，則仍需進一步收集更多寄主來源的菌株加以分析證明。

白殭菌菌株對溫度之感受性亦隨菌株不同而有差異，過去已有研究顯示，多數 *B. bassiana* 菌株最佳生長溫度在 25–28℃之間，大多數菌株於 30℃生長受阻，35℃則完全無法生長 (Parker *et al*. 2003)。本研究考量白殭菌實際應用所面臨的環境條件，需篩選具高溫耐受性的本土白殭菌菌株，試驗結果顯示不同菌株對溫度耐受性具顯著差異，自咖啡果小蠹分離白殭菌菌株當中，以 B025 菌株菌絲生長速度較快且適合生長溫度範圍較廣，於 25℃與30℃菌絲生長速率均為 3 mm d^{-1} 以上，而其餘分離株則以 30℃為較適合生長溫度，此與 Parker *et al*. (2003) 收集白殭菌菌株溫度適應範圍具有明顯的差異性。另由荔枝椿象分離白殭菌於高溫環境生長速率慢，以 20–25℃為較適生長溫度，此與咖啡果小蠹分離株有所差異。孢子發芽率試驗結果顯示，各分離株以 25–30℃為較適孢子發芽溫度 (發芽率皆達 90% 以上)，且多數孢子發芽率隨著溫度增加至 32℃與34℃而顯著降低。在 32℃環境下仍具良好孢子發芽率者為分離株 B001、B005、B025 及 B068 (發芽率 80.8–98.0%)，其餘分離株發芽率僅 12.8–59.5%。當溫度上升至 34℃，僅有分離株 B005 與 B068 仍有極少數孢子發芽 (發芽率 7.3–14.5%)，其餘分離株孢子皆無法順利發芽。由於各菌株的生長與發芽對溫度的感受性不盡相同，未來在選擇菌株進一步開發時，應根據環境選擇最適合的菌株，以達最佳的防治效果。

找尋具開發潛力白殭菌分離株為本研究主要目的之一，由於台灣環境為高溫多濕，因此於高溫環境下菌株致病力表現為篩選關鍵。於本研究，多數供試菌株在 25℃環境下的致病力皆相當，於接種後第 7 日可達 100% 致死率，但於 32℃高溫環境下，僅以分離株 B005、B039 及 B068 之致病力較佳。儘管白殭菌為寄主範圍極廣的蟲生真菌，被應用在防治多種害蟲 (Zimmermann 2007)，但各菌株間對於相同寄主的致病力仍存在差異。Bayman *et al*. (2021) 曾比較波多黎各本土白殭菌分離株的致病力，29 支分離株之中，部分菌株與市售商品 Mycotrol® 白殭菌 GHA 品系於 24℃下皆具良好的殺蟲效果 (致死率 > 80%)，但亦有少數菌株致死率未達 50%。由此可知，各菌株儘管皆分離自咖啡果小蠹，但仍可能因採集地點環境等因素，以致不同分離株致病力表現呈現顯著差異。此外，源自不同寄主分離株對於咖啡果小蠹致病力亦不盡相同，2 支分離自荔枝椿象菌株於室內生物檢定試驗之致病力並不理想，此為本研究值得留意的一項結果。根據 Bayman *et al*. (2021) 之田間試驗，本土採集分離株於田間的感染率與持效性表現皆優於市售商品菌株，儘管該些本土菌株與市售菌株於室內生物檢定下表現並無顯著差異，該文獻推測由於菌株 GHA 係分離自美國奧勒岡 (Oregon)，因此該品系或許較不耐波多黎各當地濕熱的咖啡園環境，以至於菌株在田間表現效果較差。

目前我國已核准蟲生真菌之微生物農藥較少，市面上僅 1 種核准於防治十字花科蔬菜小菜蛾的白殭菌商品，而該藥劑未公告於防治咖啡果小蠹，現行亦無登記或延伸使用藥劑可供防治咖啡果小蠹使用，且本研究已顯示不同白殭菌分離株對果小蠹的致病力有顯著差異，例如由荔枝椿象分離之分離株對咖啡果小蠹致病力效果較差。因此，亟需篩選出適合本土咖啡產區環境之高致病力白殭菌分離株以供咖啡產業應用。本研究經室內菌株篩選，目前已篩選 B068 等分離株為具開發潛力菌株，將續以田間試驗與量產試驗作進一步實用性評估。此外，因白殭菌受日照與溫度等因子影響甚大，透過製劑可有效提升白殭菌田間防蟲效果 (de Oliveira *et al*. 2018; Melo *et al*. 2020)，故將候選分離株製劑為耐受環境之產品，亦為本團隊未來研究方向之一，期望藉由以上研究，未來能開發適合台灣咖啡栽培使用防治咖啡果小蠹之本土白殭菌產品，裨益咖啡產業發展。

引用文獻

Aristizábal, L. F., M. Jiménez, A. E. Bustillo, and S. P. Arthurs. 2011. Monitoring cultural practices for coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) management in a small coffee farm in Colombia. Fla. Entomol. 94:685–

687. doi:10.1653/024.094.0334

Aristizábal, L. F., O. Lara, and S. P. Arthurs. 2012. Implementing an integrated pest management program for coffee berry borer in a specialty coffee plantation in Colombia. J. Integr. Pest Manag. 3:1–5. doi:10.1603/IPM11006

Aristizábal, L. F., A. E. Bustillo, and S. P. Arthurs. 2016. Integrated pest management of coffee berry borer: Strategies from Latin America that could be useful for coffee farmers in Hawaii. Insects 7:6. doi:10.3390/insects7010006

Aristizábal, L. F., M. Johnson, S. Shriner, R. Hollingsworth, N. C. Manoukis, R. Myers, P. Bayman, and S. P. Arthurs. 2017. Integrated pest management of coffee berry borer in Hawaii and Puerto Rico: Current status and prospects. Insects 8:123. doi:10.3390/insects8040123

Baker, P. S., J. F. Barrera, and A. Rivas. 1992. Life-history studies of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*, Scolytidae) on coffee trees in southern Mexico. J. Appl. Ecol. 29:656–662. doi:10.2307/2404473

Bayman, P., Y. A. Mariño, N. M. García-Rodríguez, O. F. Oduardo-Sierra, and S. A. Rehner. 2021. Local isolates of *Beauveria bassiana* for control of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* in Puerto Rico: Virulence, efficacy and persistence. Biol. Control 155:104533. doi:10.1016/j.biocontrol.2021.104533

Benavides, P., C. Góngora, and A. Bustillo. 2012. IPM program to control coffee berry borer *Hypothenemus hampei*, with emphasis on highly pathogenic mixed strains of *Beauveria bassiana*, to overcome insecticide resistance in Colombia. p.512–540. *in*: Insecticides-Advances in Integrated Pest Management. (Perveen, F. K., ed.) InTech Europe. Rijeka, Croatia. 724 pp.

Bustillo, A. E., R. Cardenas, D. A. Villalba, P. Benavides, J. Orozco, and F. J. Posada. 1998. Manejo Integrado de la Broca del Café: *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en Colombia. Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia. 134 pp. (in Spanish)

Bustillo, A. E., M. G. Bernal, P. Benavides, and B. Chaves. 1999. Dynamics of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* infecting *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) populations emerging from fallen coffee berries. Fla. Entomol. 82:491–498. doi:10.2307/3496468

Celar, F. A. and K. Kos. 2016. Effects of selected herbicides and fungicides on growth, sporulation and conidial germination of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Pest Manag. Sci. 72:2110–2117. doi:10.1002/ps.4240

Cure, J. R., D. Rodríguez, A. P. Gutierrez, and L. Ponti. 2020. The coffee agroecosystem: Bio-economic analysis of coffee berry borer control (*Hypothenemus hampei*). Sci. Rep. 10:12262. doi:10.1038/s41598-020-68989-x

Damon, A. 2000. A review of the biology and control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). Bull. Entomol. Res. 90:453–465. doi:10.1017/S0007485300000584

Darriba, D., G. L. Taboada, R. Doallo, and D. Posada. 2012. jModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. Nat. Methods 9:772. doi:10.1038/nmeth.2109

Davis, A. P., R. Govaerts, D. M. Bridson, and P. Stoffelen. 2006. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). Bot. J. Linn. Soc. 152:465–512. doi:10.1111/j.1095-8339.2006.00584.x

de Faria, M. R. and S. P. Wraight. 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biol. Control 43:237–256. doi:10.1016/j.biocontrol.2007.08.001

De La Rosa, W., R. Alatorre, J. F. Barrera, and C. Toriello. 2000. Effect of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) upon the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae) under field conditions. J. Econ. Entomol. 93:1409–1414. doi:10.1603/0022-0493-93.5.1409

de Oliveira, D. G. P., R. B. Lopes, J. M. Rezende, and I. Delalibera. 2018. Increased tolerance of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* conidia to high temperature provided by oil-based formulations. J. Invertebr. Pathol. 151:151–157. doi:10.1016/j.jip.2017.11.012

Dufour, B. P., I. W. Kerana, and F. Ribeyre. 2021. Population dynamics of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) according to the phenology of *Coffea arabica* L. in equatorial conditions of North Sumatra. Crop Prot. 146:105639. doi:10.1016/j.cropro.2021.105639

Escobar-Ramírez, S., I. Grass, I. Armbrecht, and T. Tscharntke. 2019. Biological control of the coffee berry borer: Main natural enemies, control success, and landscape influence. Biol. Control 136:103992. doi:10.1016/j.biocontrol.2019.05.011

Food and Agriculture Organization of the United Nations. n.d. https://www.fao.org/statistics (visit on 2/18/2023)

Góngora, C. E., P. Marín, and P. Benavides-Machado. 2009. Claves para el éxito del hongo *Beauveria bassiana* como controlador biológico de la broca del café. Avances técnicos Cenicafé 384:1–8. (in Spanish)

Greco, E. B., M. G. Wright, J. Burgueño, and S. T.

Jaronski. 2018. Efficacy of *Beauveria bassiana* applications on coffee berry borer across an elevation gradient in Hawaii. Biocontrol Sci. Technol. 28:995–1013. doi:10.1080/09583157.2018.1493088

Guyot, R., P. Hamon, E. Couturon, N. Raharimalala, J. J. Rakotomalala, S. Lakkanna, S. Sabatier, A. Affouard, and P. Bonnet. 2020. WCSdb: A database of wild *Coffea* species. Database 2020:baaa069. doi:10.1093/database/baaa069

Hollingsworth, R. G., L. F. Aristizábal, S. Shriner, G. M. Mascarin, R. de Andrade Moral, and S. P. Arthurs. 2020. Incorporating *Beauveria bassiana* into an integrated pest management plan for coffee berry borer in Hawaii. Front. Sustain. Food Syst. 4:22. doi:10.3389/fsufs.2020.00022

Inglis, G. D., M. S. Goettel, T. M. Butt, and H. Strasser. 2001. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. p.23–69. *in*: Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potentials. (Butt T. M., C. W. Jackson, and N. Magan, eds.) CABI Publ. Wallingford, UK. 390 pp. doi:10.1079/9780851993560.0023

Johnson, M. A., C. P. Ruiz-Diaz, N. C. Manoukis, and J. C. Verle Rodrigues. 2020. Coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*), a global pest of coffee: Perspectives from historical and recent invasions, and future priorities. Insects 11:882. doi:10.3390/insects11120882

Kawabata, A. M., S. T. Nakamoto, M. Miyahira, and R. T. Curtiss. 2020. Recommendations for coffee berry borer integrated pest management in Hawai‘i 2020. College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii at Manoa. https://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/IP-47.pdf (visit on 2/18/2023)

Khonsanit, A., J. J. Luangsa-Ard, D. Thanakitpipattana, W. Noisripoom, T. Chaitika, and N. Kobmoo. 2020. Cryptic diversity of the genus *Beauveria* with a new species from Thailand. Mycol. Prog. 19:291–315. doi:10.1007/s11557-020-01557-9

Kouassi, M., D. Coderre, and S. I. Todorova. 2003. Effects of the timing of applications on the incompatibility of three fungicides and one isolate of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycotina). J. Appl. Entomol. 127:421–426. doi:10.1046/j.1439-0418.2003.00769.x

Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson, and D. G. Higgins. 2007. Clustal W and clustal X version 2.0. Bioinformatics 23:2947–2948. doi:10.1093/bioinformatics/btm404

Leung, P. S., A. Kawabata, and S. T. Nakamoto. 2014. Estimated economy-wide impact of CBB for the crop years 2011/12 and 2012/13. Brief Report at Request of Hawaii Congressional Delegation. https://www.hawaiicoffeeed.com/uploads/2/6/7/7/26772370/estimated_economic_impact_of_cbb_in_hawaii.pdf (visit 2/18/2023)

Lin, M. Y., Y. F. Wu, and S. K. Chen. 2010. Monitoring survey of coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, and its control in the field. Res. Bull. TNDARES 56:35–44. (in Chinese with English abstract) doi:10.29558/XLZY.201012.0004

Mariño, Y. A., V. J. Vega, J. M. García, J. C. Verle Rodrigues, N. M. García, and P. Bayman. 2017. The coffee berry borer (Coleoptera: Curculionidae) in Puerto Rico: Distribution, infestation, and population per fruit. J. Insect Sci. 17:58. doi:10.1093/jisesa/iew125

Mascarin, G. M. and S. T. Jaronski. 2016. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. World J. Microbiol. Biotechnol. 32:177. doi:10.1007/s11274-016-2131-3

Melo, M. R., M. F. Zotarelli, L. D. Santos, and E. Silveira. 2020. Selection of surfactants for enhancing the wettability of powder formulations of *Beauveria bassiana* (bals.-criv.) vuill. (1912) (Ascomycota: Cordycipitaceae). Biol. Control 151:104391. doi:10.1016/j.biocontrol.2020.104391

Monzón, A. J., F. Guharay, and I. Klingen. 2008. Natural occurrence of *Beauveria bassiana* in *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) populations in unsprayed coffee fields. J. Invertebr. Pathol. 97:134–141. doi:10.1016/j.jip.2007.07.008

Oliveira, C. M., A. M. Auad, S. M. Mendes, and M. R. Frizzas. 2012. Economic impact of exotic insect pests in Brazilian agriculture. J. Appl. Entomol. 137:1–15. doi:10.1111/jen.12018

Parker, B. L., M. Skinner, S. D. Costa, S. Gouli, W. Reid, and M. El Bouhssini. 2003. Entomopathogenic fungi of *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae): Collection and characterization for development. Biol. Control 27:260–272. doi:10.1016/S1049-9644(03)00017-3

Pell, J. K., J. J. Hannam, and D. C. Steinkraus. 2010. Conservation biological control using fungal entomopathogens. BioControl 55:187–198. doi:10.1007/s10526-009-9245-6

Rehner, S. A. and E. Buckley. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-alpha sequences: Evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps teleomorphs*. Mycologia 97:84–98. doi:10.3852/mycologia.97.1.84

Rehner, S. A., F. Posada, E. P. Buckley, F. Infante, A.

Castillo, and F. E. Vega. 2006. Phylogenetic origins of African and Neotropical *Beauveria bassiana* s.l. pathogens of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. J. Invertebr. Pathol. 93:11–21. doi:10.1016/j.jip.2006.04.005

Rezende, J. B. and M. H. Taniwaki. 2020. Coffee berry borer (Coleoptera: Curculionidae): An opening for fungi and toxins? Coffee Sci. 15:e151751. doi:10.25186/.v15i.1751

Roberti, R., H. Righini, A. Masetti, and S. Maini. 2017. Compatibility of *Beauveria bassiana* with fungicides *in vitro* and on zucchini plants infested with *Trialeurodes vaporariorum*. Biol. Control 113:39–44. doi:10.1016/j.biocontrol.2017.06.006

Ronquist, F., M. Teslenko, P. van der Mark, D. L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M. A. Suchard, and J. P. Huelsenbeck. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Syst. Biol. 61:539–542. doi:10.1093/sysbio/sys029

Ruiz-Cárdenas, R. and P. Baker. 2010. Life table of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) in relation to coffee berry phenology under Colombian field conditions. Sci. Agric. 67:658–668. doi:10.1590/S0103-90162010000600007

Sanchez, E., B. P. Dufour, A. P. Olivas, E. D. M. Virginio-Filho, S. Vilchez, and J. Avelino. 2013. Shade has antagonistic effects on coffee berry borer. p.729–736. *in*: Proceeding of the 24th International Conference on Coffee Science. November 12–16, 2012. San José, Costa Rica. ASIC, Paris, France.

Staver, C., F. Guharay, D. Monterroso, and R. G. Muschler. 2001. Designing pest-suppressive multistrata perennial crop systems: Shade-grown coffee in Central America. Agrofor. Syst. 53:151–170. doi:10.1023/A:1013372403359

Sun, S., Z. Wang, A. Liu, S. Lai, J. Wang, Q. Meng, Y. Gou, A. J. Johnson, and Y. Li. 2020. First record of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) on Hainan Island, China. Coleopt. Bull. 74:710–713. doi:10.1649/0010-065X-74.4.710

Usha, J., M. N. Babu, and V. Padmaja. 2014. Detection of compatibility of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. with pesticides, fungicides and botanicals. Int. J. Plant Anim. Environ. Sci. 4:613–624.

Vaidya, G., D. J. Lohman, and R. Meier. 2011. SequenceMatrix: Concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. Cladistics 27:171–180. doi:10.1111/j.1096-0031.2010.00329.x

Vega, F. E., F. Infante, A. Castillo, and J. Jaramillo. 2009. The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae): A short review, with recent findings and future research directions. Terr. Arthropod. Rev. 2:129–147. doi:10.1163/187498209X12525675906031

Vega, F. E., M. Kramer, and J. Jaramillo. 2011. Increasing coffee berry borer (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) female density in artificial diet decreases fecundity. J. Econ. Entomol. 104:87–93. doi:10.1603/ec10353

Vega, F. E., A. P. Davis, and J. Jaramillo. 2012. From forest to plantation? Obscure articles reveal alternative host plants for the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae). Biol. J. Linn. Soc. Lond. 107:86–94. doi:10.1111/j.1095-8312.2012.01912.x

Vega, F. E., F. Infante, and A. J. Johnson. 2015a. The genus *Hypothenemus*, with emphasis on *H. hampei*, the coffee berry borer. p.427–494. *in*: Bark Beetles: Biology and Ecology of Native and Invasive Species. (Vega, F. E. and R. W. Hofstetter, eds.) Academic Press. San Diego, CA. 640 pp. doi:10.1016/B978-0-12-417156-5.00011-3

Vega, F. E., A. Simpkins, G. Bauchan, J. M. Valdéz-Carrasco, A. Castillo, and F. Infante. 2015b. A mysterious wing spine in male coffee berry borers (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). Fla. Entomol. 98:352–353. doi:10.1653/024.098.0155

Vega, F. E., L. T. Smith, N. M. J. Davies, J. Moat, T. Góral, R. O'Sullivan, and A. P. Davis. 2019. Elucidation of hosts, native distribution, and habitat of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) using herbaria and other museum collections. Front. Plant Sci. 10:1188. doi:10.3389/fpls.2019.01188

Vega, V. J., Y. A. Mariño, D. Deynes, E. B. Greco, D. E. Bright, and P. Bayman. 2020. A beetle in a haystack: Are there alternate hosts of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) in Puerto Rico? Agronomy 10:228. doi:10.3390/agronomy10020228

Vera, J. T., E. C. Montoya, P. Benavides, and C. E. Góngora. 2011. Evaluation of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as a control of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) emerging from fallen, infested coffee berries on the ground. Biocontrol Sci. Technol. 21:1–14. doi:10.1080/09583157.2010.517605

Villalba-Gault, D. A., A. E. Bustillo-Pardey, and B. Chaves-Cordoba. 1995. Evaluación de insecticidas para el control de la broca del café en Colombia. Cenicafé 46:152–163. (in Spanish with English abstract)

White, T. J., T. D. Bruns, S. B. Lee, and J. W. Taylor.

1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. p.315–322. *in*: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. (Innis, M. A, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, eds.) Academic Press. San Diego, CA. 482 pp. doi:10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1

Woodill, A. J., S. T. Nakamoto, A. M. Kawabata, and P. Leung. 2017. To spray or not to spray: A decision analysis of coffee berry borer in Hawaii. Insects 8:116. doi:10.3390/insects8040116

Wraight, S. P., S. Galaini-Wraight, R. L. Howes, L. A. Castrillo, R. I. Carruthers, R. H. Smith, T. K. Matsumoto, and L. M. Keith. 2018. Prevalence of naturally-occurring strains of *Beauveria bassiana* in populations of coffee berry borer *Hypothenemus hampei* on Hawai'i Island, with observations on coffee plant-*H. hampei*-*B. bassiana* interactions. J. Invertebr. Pathol. 156:54–72. doi:10.1016/j.jip.2018.07.008

Wraight, S. P., S. Galaini-Wraight, R. L. Howes, L. A. Castrillo, M. H. Griggs, R. I. Carruthers, R. H. Smith, T. K. Matsumoto, and L. M. Keith. 2021. Efficacy of *Beauveria bassiana* strain GHA spray applications against coffee berry borer *Hypothenemus hampei* on Hawai'i Island. Biol. Control 161:104587. doi:10.1016/j.biocontrol.2021.104587

Zimmermann, G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. Biocontrol Sci. Technol. 17:553–596. doi:10.1080/09583150701309006

附錄. 用於白殭菌親緣分析序列之 GenBank 資料庫登錄碼。

Appendix. GenBank accession numbers for DNA sequences of *Beauveria* spp. used in the phylogenetic analyses.

Species	Isolate	GenBank number[z,y]		
		ITS	Bloc	EF1-α
Beauveria amorpha	ARSEF1969	AY31998	HQ880738	AY531907
B. asiatica	ARSEF4384	AY532026	HQ880716	AY531935
B. bassiana	ARSEF1040	AY531972	HQ880689	AY531881
B. bassiana	ARSEF1478	AY531981	HQ880695	AY531890
B. bassiana	ARSEF1564	HQ880761	HQ880692	HQ880974
B. bassiana	ARSEF1811	AY531992	HQ880696	AY531901
B. bassiana	ARSEF1848	AY531995	HQ880696	AY531904
B. bassiana	ARSEF300	AY532015	HQ880690	AY531924
B. bassiana	ARSEF751	AY532045	HQ880694	AY531954
B. bassiana	ARSEF7518	HQ880762	HQ880693	HQ880975
B. bassiana	BCC1446	MN401671	MN401541	MN401499
B. bassiana	BCC1848	MN401670	MN401540	MN401498
B. bassiana	BCC21293	MN401654	MN401535	MN401482
B. bassiana	BCC23823	MN401662	MN401536	MN401490

附錄. 用於白殭菌親緣分析序列之 GenBank 資料庫登錄碼。(續)

Appendix. GenBank accession numbers for DNA sequences of *Beauveria* spp. used in the phylogenetic analyses. (continued)

Species	Isolate	GenBank number[z,y]		
		ITS	Bloc	EF1-α
B. bassiana	BCC2655	MN401668	MN401538	MN401496
B. bassiana	BCC45145	MN401667	MN401537	MN401495
B. bassiana	BCC79681	MN401669	MN401539	MN401497
B. bassiana	**B001**	**ON417456**	**ON462318**	**ON462329**
B. bassiana	**B005**	**ON417446**	**ON462308**	**ON462319**
B. bassiana	**B015**	**ON417447**	**ON462309**	**ON462320**
B. bassiana	**B025**	**ON417448**	**ON462310**	**ON462321**
B. bassiana	**B039**	**ON417449**	**ON462311**	**ON462322**
B. bassiana	**B045**	**ON417450**	**ON462312**	**ON462323**
B. bassiana	**B068**	**ON417451**	**ON462313**	**ON462324**
B. bassiana	**B070**	**ON417452**	**ON462314**	**ON462325**
B. bassiana	**B098**	**ON417453**	**ON462315**	**ON462326**
B. bassiana	**B102**	**ON417454**	**ON462316**	**ON462327**
B. brongniartii	ARSEF2271	HQ880779	HQ880710	HQ880988
B. caledonica	ARSEF1567	AY531986	HQ880747	AY531894
B. gryllotalpidicola	BCC75788	MN401623	MN401505	MN401449
B. hoplocheli	Bt121	KC339687	KM453968	KC339704
B. kipukae	ARSEF7032	HQ880803	HQ880734	HQ881005
B. lii	RCEF5500	JN689372	JN689373	JN689371
B. majiangensis	GZU12141	MG052642	MG052639	MG052640
B. medogensis	2898	KU994837	KU994836	KU994833
B. mimosiformis	BCC75812	MN401672	MN401542	MN401500
B. pseudobassiana	ARSEF1855	HQ880796	HQ880727	HQ880999
B. sungii	ARSEF1685	AY531990	HQ880740	AY531899
B. varroae	ARSEF2694	HQ880802	HQ880733	HQ881004
B. vermiconia	ARSEF2922	AY532012	HQ880753	AY531920
Isaria cicadae	ARSEF7260	HQ880826	HQ880757	HQ881017

[z] ITS: internal transcribed spacer regions 1 and 2, including the 5.8S ribosomal RNA gene; Bloc: B locus intergenic region; EF1-α: translation elongation factor 1-α.

[y] Isolates in boldface were obtained in this study.

Natural Occurrence and Selection of *Beauveria bassiana* Isolates in Coffee Berry Borers in Taiwan

Po-Hung Chen[1], Yu-Ping Liang[1], and Hui-Fang Ni[2,*]

Abstract

Chen, P. H., Y. P. Liang, and H. F. Ni. 2023. Natural occurrence and selection of *Beauveria bassiana* isolates in coffee berry borers in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 72(3):219–236.

Beauveria bassiana (Bb) is an important microbial biocontrol agent for controlling the coffee berry borer (CBB, *Hypothenemus hampei*) in many countries; however, no commercial Bb product is currently available to the coffee industry in Taiwan. Therefore, the aims of this study were to investigate the natural infection rate of CBB in local coffee orchards, and to screen native Bb isolates as potential control agents against CBB through isolation, identification, and laboratory tests. The results showed that the natural prevalence of Bb varied dramatically among different orchards. In an experimental orchard in Gukeng Township, Yunlin County (extensive farming), the maximum infection rate of female CBB in infested berries was 13.3% (averaged 3.1%). The incidence peaked from March to June, showing 70.0% of dead CBB females were infected with Bb. However, in the other orchard in Ren-ai Township, Nantou County (conventional farming), the infection rate was very low, with a maximum of only 4.9% (averaged 0.6%). To screen isolates with biocontrol potential, a total of 98 isolates were collected from the production areas, including Taichung, Nantou, Yunlin, etc. Seven isolates were selected and identified as Bb by cultural morphology and DNA sequences of internal transcribed spacer, B locus intergenic region, and translation elongation factor 1-α. The mycelial growth rate, spore germination rate, and virulence to CBB varied among isolates at different temperatures. Isolates B005, B025, and B068 were more tolerant to high temperatures, the spore germination rates of which were 98%, 94%, and 88% at 32℃, respectively, while the germination rates of most other isolates were 30–60%. Most isolates had higher virulence to female CBB at 25℃, resulting in a mortality rate of 100% 8 days post-inoculation (dpi). All isolates failed to cause 100% mortality 8 dpi at 32℃, while B005, B039, and B068 had better performance, which caused 67%, 72%, and 77% mortality 8 dpi, respectively. In future research, we will continue screening isolates with biocontrol potential, and formulate Bb products with B068. We hope to develop commercial Bb products that will be suitable for managing CBB in the Taiwanese coffee cultivation system and help to improve the coffee industry.

Key words: Coffee berry borer, *Beauveria bassiana*, Biological control.

Received: February 18, 2023; Accepted: April 7, 2023.

[*] Corresponding author, email: hfni@tari.gov.tw

[1] Assistant Research Fellows, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

[2] Associate Research Fellow and Division Director, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 72(3):237–254 (2023)
DOI:10.6156/JTAR.202309_72(3).0004

研究報告

比較高壓靜電場不同強度及時間處理對不同品種砧木茄子種子之影響

陳怡菁[1]　楊純明[2,3,4]　邱凱瑩[5,*]

摘要

陳怡菁、楊純明、邱凱瑩。2023。比較高壓靜電場不同強度及時間處理對不同品種砧木茄子種子之影響。台灣農業研究 72(3):237–254。

嫁接無性繁殖除了砧木與接穗之間的融合親合性議題之外，目前台灣在地茄子種苗產業關注的課題，尚包括如何改善砧木型種子在 15℃低溫下出現的發芽行為差異性，裨益於種苗生長之管理。據此，本研究選用 2 種砧木型茄子 ‘A105’ 與 ‘A108’ 品種種子，探討在 15℃低溫環境下品種間發芽行為差異，包括發芽百分比、平均發芽時間、吸水率、滲漏電導度及種子內部可溶性蛋白質含量等性狀，以及利用高壓靜電場 (high-voltage electrostatic field; HVEF) 處理後造成之改變與改善效果。根據試驗結果，發現兩茄子品種在上述各性狀表現上存在品種間差異，以 HVEF 處理將可以改變種子發芽性狀。其中，種子經過 HVEF 0.5 kV cm^{-1} 處理 600 s 後，‘A105’ 品種之種子發芽百分比由 94.67% 增至 100%，平均發芽時間以 10.0 kV cm^{-1} 處理 600 s 後，由 7.86 d 顯著縮短至 6.48 d，吸水速率在浸潤 72 h 後出現第二波快速吸水現象、而滲漏電導度值在 0.5 kV cm^{-1} 處理 60–600 s 後，明顯高於對照組 (control check; CK)；種子內部可溶性蛋白質含量顯示出 CK 含量低於處理組，而且經過電場處理後可以在第 1 日即快速誘導可溶性蛋白質含量的增加到最大值。‘A108’ 品種種子發芽百分比經 1.0 kV cm^{-1} 60 s 處理，則由 44.67% 大幅提升至 93.33%，平均發芽時間由 11.92 d 明顯縮短至 10.82 d，吸水速率在浸潤後 12 h 達到吸水飽和，直到 120 h 出現第二波快速吸水現象，而滲漏電導度則無論 CK 或處理組，其滲漏電導度值概在浸潤後的 6–8 h 最高，隨後開始下降。以 0.5 kV cm^{-1} 與 1.0 kV cm^{-1} 處理，滲漏電導度值皆低於 CK，增加 HVEF 的強度並未顯著提高滲漏電導度值。種子內部可溶性蛋白質含量在 CK 第 0–3 日之數值皆低於處理組，直至第 5 日才有明顯的提升。另經由掃描式電子顯微鏡 (scanning electron microscope; SEM) 呈現兩品種在種皮厚度與顯微構造上之差異，‘A105’ 種子種皮顯微組織較為寬鬆，可以看到明顯裂縫，而 ‘A108’ 種子種皮顯微組織則相對較為緊密，裂縫微小。以 HVEF 0.5 kV 600 s 強度處理後，兩品種的種皮開始出現構造上的改變，‘A105’ 種子種皮表面破洞明顯加劇，而 ‘A108’ 的種子種皮表面雖有種皮破裂，但沒有 ‘A105’ 的破洞顯著。綜合試驗結果，推測種子種皮厚薄與組織結構不同可能係造成參試 2 種茄子品種種子發芽性狀不一致的原因，間接影響種子的生理作用與發芽行為。然而原本 ‘A108’ 品種種子發芽表現不佳的情形，經過適當的 HVEF 處理後可以有效提高種子發芽百分比、吸水率及滲漏電導度，縮短平均發芽時間，並促使種子內部可溶性蛋白質含量被提前誘導，從而改善種子的發芽表現。

關鍵詞：茄子種子、發芽百分比、平均發芽時間、滲漏電導度、高壓靜電場。

收件日期：2023 年 2 月 7 日；接受日期：2023 年 4 月 29 日。
* 通訊作者：cky@mdu.edu.tw
[1] 明道大學智慧暨精緻農業學系計畫專任助理。台灣 彰化縣。
[2] 明道大學智慧暨精緻農業學系客座教授。台灣 彰化縣。
[3] 明道大學智慧暨精緻農業學系講座教授。台灣 彰化縣。
[4] 明道大學智慧農業研究中心主任。台灣 彰化縣。
[5] 明道大學智慧暨精緻農業學系教授。台灣 彰化縣。

前言

茄子 (*Solanum melongena* L.) 係茄科 (Solanaceae) 茄屬 (*Solanum*) 之一年或二年生草本植物，亦稱長茄、矮茄或圓茄等，分布範圍廣泛 (Xiao 2018)。茄子果實富含碳水化合物、蛋白質及一些礦物質 (如鈣、鎂及磷)，熱量則較低 (約 25 kcal 100 g^{-1}) (Aly *et al*. 2019)。全球的茄子年產量超過 5,000 萬公噸，是繼馬鈴薯、番茄、胡椒及煙草之後全球第 5 大茄科重要經濟作物 (Aly *et al*. 2019)。近年來由於民眾重視健康飲食，使得包含茄子在內的蔬菜消費量大增，世界各國對蔬菜種子的需求量與日俱增。除了要求優良品質與活力的種子，亦需要發育強健的苗株，因此突顯出合適種子處理技術的重要性 (Medeiros *et al*. 2015)。

茄子係喜溫性植物，為台灣夏秋季重要蔬菜之一。在低於 15℃的逆境條件下，常出現發芽與出苗緩慢、發芽不整齊及成苗率降低的現象，也會降低種子儲存物質的水分吸收與啟動速度導致發芽過程延遲，並降低幼苗生長或甚至常導致畸型幼苗的發生 (Marcos Filho 2015)。目前穴盤育苗業者要求發芽率的一致性、發芽百分比在 95% 以上，因此對於有效的種子處理以提高種子發芽表現的需求更為殷切。又由農業部 2020 年農業統計年報顯示，台灣茄子栽植面積達 1,323 ha、生產量為 35,344 Mg，每公頃面積產量為 26.7 Mg (https://agr.afa.gov.tw/afa/afa_frame.jsp)。因此，為期推動茄子產業的持續發展，開發能夠提升茄子種子發芽率與種苗活力的種子處理技術，殊有其需要與必要。

萌發是種子生命週期中的重要過程，經過一系列複雜的生理與生化現象，受到種子活力、溫度及時間的影響 (Xu 2019)。種子萌發初期，種子內的儲藏蛋白質、澱粉及脂質等養分，藉由浸 (吸) 潤作用 (imbibition) 進行水解，除了產生各種酶 (酵素)，澱粉或蔗糖水解為葡萄糖等單糖，脂質亦可水解轉換為單糖，蛋白質則水解成胺基酸後又重新組成新蛋白質。在物質轉換過程中，呼吸作用增加、胚細胞增生且體積逐漸增大，最終突破種皮完成發芽階段 (Taiz & Zeiger 2002; Luo *et al*. 2017)。種子發芽過程一般可概分為 3 個階段，在階段 1，水合作用啟動，乾燥種子在適當的溫度與濕度條件下開始吸收水分，種子吸水是一種非生命的物理過程，在細胞水合後，生理活性被誘導；在階段 2，種子保持穩定的含水量，代謝活性增加，觸發生化過程。在此階段結束前，發芽是可逆的，因在滲調後乾燥的種子於儲存期間仍然存活，隨後可在有利的環境條件下重新開始發芽；至階段 3，種子在合適條件下胚根突破種皮形成幼根，胚軸伸長促使胚芽伸出土面，完成發芽過程的 3 個階段 (Singh *et al*. 2020)。經過特殊處理的種子，則可在短時間內吸收水分開始生長，提前完成發芽過程。在種子成熟乾燥與貯藏過程中，細胞膜的結構被維持在凝膠相；當重新水合時，則轉變成為液晶相。在相變過程中，吸水種子的種皮會有一些膜的損害，導致溶質從細胞內滲漏出來，也因此降低種子內抑制物質的濃度從而促進種子萌發 (Bewley *et al*. 2013; Singh *et al*. 2020)。

在種子的特殊處理中，高壓靜電場處理 (high-voltage electrostatic field; HVEF) 是一種較為新型的物理技術，生物效應明顯、對環境友善，具有裝置簡單與操作方便等特點。HVEF 處理已廣泛應用於農業生產技術，被發現能夠促進植物生長，並可提高若干植物抗逆境與促進癒傷組織的形成 (Hu *et al*. 2017; Xu *et al*. 2019)。種子活力是評價種子品質的重要指標，活力高的種子具有顯著的生長優勢與高產潛力，係現代農業高效高產的首要條件。種子經過 HVEF 處理後，不僅改變種子細胞膜的通透性、增加細胞內酶的活性、加速細胞有絲分裂及胚根發育，亦促進細胞代謝並顯著提高種子活力 (Yan *et al*. 2017)。HVEF 處理亦可透過蛋白質結構修飾，激活各種酶的活性來增強種子的發芽 (Chiu 2022)，也可能提高膜的通透性及種子內部的自由基，導致膜通透性的增加，以提前打破種子休眠並促進種子代謝 (Wu *et al*. 2005)。由此顯示，HVEF 處理對於細胞膜的通透性會有一定程度的影響 (Xiao 2018)，值得進一步研究探討其在不同蔬菜種子的應用性。

因此，本試驗將以砧木型茄子種子為材料，選擇具有不同種子發芽行為與種皮構造的2個品種，經以不同強度與時間的HVEF處理後，置於15℃低溫環境來探討種子萌發情形與處理效果，並究明種子內部多項生理與生化反應之改變。希望藉由提供試驗結果，俾於未來利用於提高其種子發芽百分比與縮短發芽所需時間，改善砧木型種子在低溫環境下出現的發芽行為差異性。

材料與方法

本試驗使用砧木型茄子 ‘A105’ 與 ‘A108’ 品種之種子 (瑞成種苗有限公司，台灣台中市)，以內層聚乙烯 (polyethylene; PE) 夾鏈袋與外層牛皮紙袋保存，放置於4℃冰箱待用。試驗調查項目如下：

發芽試驗

將種子分為處理組與對照組 (CK)，每組50粒種子，3重複。採紙間法實施發芽試驗時，以濾紙為發芽介質，將種子置於2層濾紙 (Advantec 定性濾紙，1號，90 mm；Advantec, Tokyo, Japan) 上，其上再覆蓋1層濾紙，加入適量的逆滲透 (reverse osmosis; RO) 水後置於15℃之恆溫生長箱中進行浸潤發芽，檢測以下種子各項發芽性狀：

(1) 發芽百分比 (germination percentage; GP)，在14 d內逐日調查發芽期間發芽種子總數 (X) 占發芽處理種子總數 (N) 之百分比 (%)，公式：$GP = (X/N) \times 100\%$。

(2) 平均發芽時間 (mean germination time; MGT)，以Ellis & Roberts (1980) 之公式計算，單位為日 (d)：$MGT = \Sigma fd/N$。其中，f：播種後第d天發芽種子數，d：播種後之天數，N：發芽處理之種子總數。

(3) 吸水率 (water absorption)，各組另取20粒種子，3重複，秤其原始重量後，以濾紙作為浸潤介質進行浸潤。經過不同時間下取出，秤其每段時間的種子重量，扣除浸潤前的種子重量估算單位時間內的吸水含量 (g)，並將不同時間之水分含量變化繪製成曲線圖。

(4) 滲漏電導度 (leakage electrical conductivity)，各組將20粒種子置於離心管中加入20 mL的RO水，在25℃浸水，3重複。經過不同時間以電導度計 (Horiba LAQUA DS-71, The Labware House, New Plymouth, New Zealand) 讀取其電導度值 (μS cm^{-1})，據以估算單位時間內的滲透電導度值。

可溶性蛋白質 (soluble protein) 含量測定

參考 Bradford (1976) 之方法，取5粒種子以2 mL磷酸鈉緩衝液 (sodium phosphate buffer, 50 mM, pH 6.8) 研磨均質，在4℃下以10,000 rpm，離心20 min。取20 μL之上清液注入試管，加入5 mL蛋白質染劑 (dye sodium)，震盪均勻後靜置約10 min，以分光光度計 (T60 spectrophotometer, PG Instruments, Lutterworth, UK) 測定595 nm之吸光值。標準曲線之製作，係取小牛血清蛋白 (bovine serum albumin; BSA) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) 1 mg溶於1 mL RO水作為標準樣品，再於試管中各分別添加10、30、50及70 μL之不同量標準樣品，然後讀取位於595 nm之吸光值繪製。

掃描式電子顯微鏡 (scanning electron microscope; SEM) 檢查

取CK與處理組的茄子種子2–3粒，以手術刀片 (可替換) 切割，並使用雙面膠帶附貼於鋁柱上，再使用Technics Hummer V SEM Sputter濺射鍍膜機 (Anatech Electronics, Garfield, NJ, USA) 為製備的樣品鍍上30 nm的金膜。在30 kV下，以HITACHI S-3400N掃描式電子顯微鏡 (Hitachi Hi-Tech Corporation, Hitachi, Tokyo, Japan) 對塗層茄子種子樣品進行掃描、檢查及拍照。

高壓靜電場 (HVEF) 處理

從冰箱取出預先準備之試驗種子，利用HVEF (SM2004-12PIR HVEF，友聲電子有限公司，台灣高雄市) 進行電場處理，每處理3重複，每重複50粒種子，另以未做任何處理為CK。處理組分為0.5、1.0、5.0及10.0 kV cm^{-1} 等4種不同強度，每個強度又分為0、60、

300 及 600 s 等 4 種不同處理時間組合。將經過 HVEF 處理後之茄子種子以前述紙間法 (下 2 上 1) 鋪放濾紙後加入 RO 水，再放置 15℃恆溫生長箱中進行各項觀察與調查並逐一記錄。

統計分析

試驗數據使用統計分析軟體 Minitab 19.0 Statistical Software (Minitab, State College, PA, USA) 進行統計分析。發芽試驗之操作實用性評估，則分別先進行變方分析，若處理之間差異顯著，再以 Fisher's Least Significant Difference (LSD) 檢測法比較處理間平均值之差異，分別有處理強度之間與處理時間之間的比較。科學統計繪圖軟體 SigmaPlot 14.0 版 (Systat Software, San Jose, CA, USA) 使用於統計繪圖，統計顯著性以 $P < 0.05$ 為標準。

結果

茄子品種 'A105' 與 'A108' 種子發芽性狀及種皮組織顯微構造差異之比較

以紙間法浸潤發芽 14 d 後，由發芽百分比結果，發現 'A105' 品種未經處理之 CK 為 94.67%，而 'A108' 品種 CK 則為 44.67%，顯示兩品種發芽百分比存在顯著差異 (圖 1A)。在平均發芽時間結果，'A105' 為 7.86 d，'A108' 則為 11.92 d，品種間有很大差別 (圖 1B)。在吸水速率上，雖然兩品種之吸水速率趨勢類似，但是 'A105' 曲線較高於 'A108' 曲線 (圖 1C)。至於種子浸水後的滲漏電導度值，可以明顯看出兩個品種的滲漏趨勢有很大的不同，'A105' 品種在浸潤後溶質快速滲漏，直到 12 h 後滲漏率才緩慢降低；而 'A108' 品種的溶質則是非常緩慢的滲漏，而且上升幅

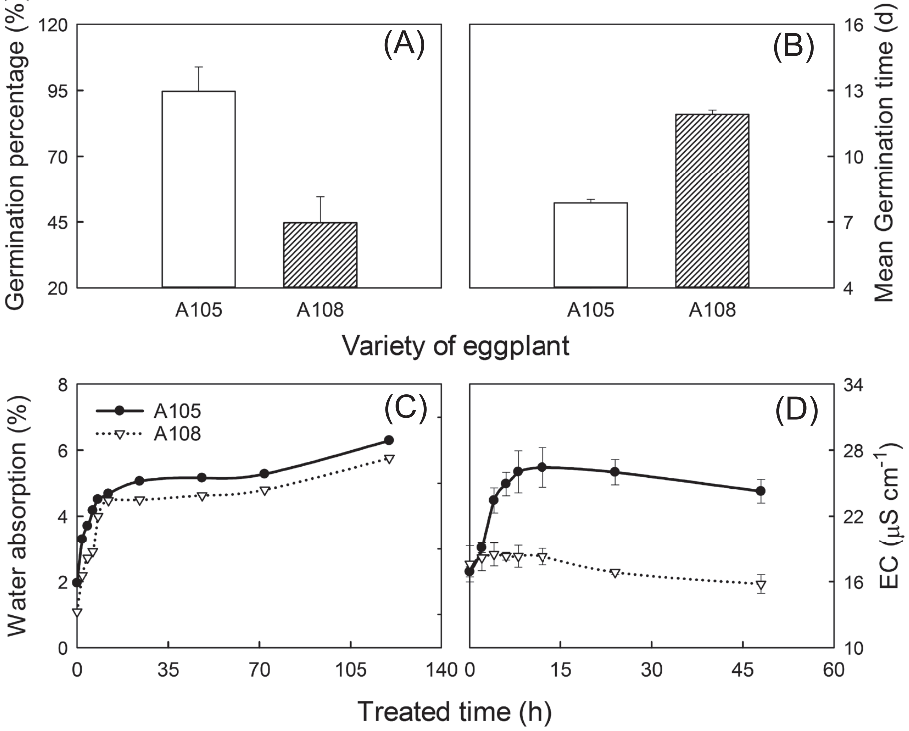


圖 1. 'A105' 與 'A108' 茄子種子之發芽性狀差異。(A) 發芽百分比；(B) 平均發芽時間；(C) 種子浸潤後吸水速率；(D) 種子浸潤後滲漏電導度值。

Fig. 1. Differences in germination traits of eggplant seeds of varieties 'A105' and 'A108'. (A) Germination percentage; (B) mean germination time; (C) water absorption after seed imbibition; and (D) leakage electrical conductivity after seed imbibition.

度不大，至浸水後 4 h 就開始有下降趨勢 (圖 1D)。由此 4 項發芽性狀參數可佐證，此兩茄子品種有顯著種子發芽行為之差異。因此，為期促進選用茄子品種種子之發芽，本試驗乃以不同強度與時間組合之 HVEF 處理，探討對於參試兩茄子品種種子發芽行為造成之效果。

在種子種皮結構上，透過掃描式電子顯微鏡 (scanning electron microscope; SEM) 放大 40× 與 70× 的照片顯示，此兩茄子品種 ‘A105’ 與 ‘A108’ 之種子縱切面或種皮表面皆呈現細密組織結構 (圖 2A 與圖 2B)。其中，‘A105’ 品種之種皮較具規則的波浪結構 (圖 2A 與圖 2C)，而 ‘A108’ 品種之種皮則較不具規則 (圖 2B 與圖 2D)，波浪間的空隙較為緊密。續由種子縱切面 350× 的 SEM 照片顯示，‘A105’ 品種 CK 種子的種皮厚度 (圖 2E) 小於 ‘A108’ 品種對照組種子的種皮厚度 (圖 2F)。浸潤後，‘A105’ 種子種皮組織有較為緊實的構造 (圖 2G)，‘A108’ 種子種皮組織則較為鬆散 (圖 2H)。

以掃描式電子顯微鏡對兩參試茄子品種種皮進行 150× 與 700× 的拍照 (圖 3)，顯示 ‘A105’ (圖 3A 與圖 3C) 種皮顯微組織較為寬鬆且具明顯裂縫 (cracks)；‘A108’ (圖 3B、圖 3D) 種皮顯微組織則相對較為緊密但裂縫微小。經過 HVEF 0.5 kV 600 s 處理後，兩品種的種皮開始出現構造上的改變，‘A105’ 的種子種皮表面破洞明顯加劇 (圖 3E 與圖 3G)，而 ‘A108’ 的種子種皮表面雖有種皮破裂，但沒有 ‘A105’ 的破洞顯著 (圖 3F 與圖 3H)。

茄子品種 ‘A105’ 與 ‘A108’ 種子 HVEF 處理效應差異之比較

除種子種皮構造所出現顯微組織外觀形態的變化，經過不同強度與時間之 HVEF 處理後，也影響茄子種子的發芽行為。雖然置於 15℃恆溫生長箱中 14 d，HVEF 處理促使 ‘A105’ 種子發芽百分比從 CK 的 94.67% 酌增至 100%，然未有統計上顯著差異；在 0.5 kV cm^{-1} 60 s 處理下，‘A108’ 種子發芽百分比則從 44.67% 大幅升高至 93.33%，惟將 HVEF 處理強度增加至 5.0 kV cm^{-1} 與 10.0 kV cm^{-1}，並未能再提高種子發芽百分比 (圖 4)。

‘A105’ 與 ‘A108’ 種子置於 15℃恆溫生長箱經過 14 d 後，CK 之平均發芽時間分別為 7.86 d 與 11.92 d (圖 5)。‘A105’ 種子平均發芽時間在 0.5 kV cm^{-1} 處理下未有顯著改變，然而當電場強度增加至 5.0 kV cm^{-1} 與 10.0 kV cm^{-1} 60 s 處理後，分別顯著縮短平均發芽時間至 6.50 d 與 6.48 d，係具有最短平均發芽時間之兩處理組合。‘A108’ 種子在 0.5 kV cm^{-1} 與 1.0 kV cm^{-1} 處理下，種子平均發芽時間已呈現顯著減少 (由 11.92 d 縮短至 10.82 d)，而當電場強度提高至 5.0 kV cm^{-1} 與 10.0 kV cm^{-1} 處理則未再減少平均發芽時間。由此可知。相較於 ‘A105’ 品種，‘A108’ 品種的種子發芽百分比較低、平均發芽時間則較長 (圖 4 與圖 5)。

‘A105’ 種子浸潤後之吸水速率快速上升，在浸潤 12 h 後達到飽和點 (圖 6)。在施加 HVEF 1.0 kV cm^{-1} 與 5.0 kV cm^{-1} 處理後，可以明顯看到在第 5 日出現第二波快速吸水，然而隨著強度增至 10.0 kV cm^{-1}，吸水速率則有被抑制情形發生。‘A108’ 種子在施加 HVEF 0.5 kV cm^{-1} 與 10.0 kV cm^{-1} 處理後，約在 8 h 時達到吸水飽和點，隨後之吸水漸緩直到第 5 日依然沒有太大的提升，而 1.0 kV cm^{-1} 與 5.0 kV cm^{-1} 處理亦有類似曲線變化，惟未見 HVEF 明顯處理效果。

茄子品種 ‘A105’ 與 ‘A108’ 種子經過 HVEF 處理對滲漏電導度影響之比較

‘A105’ 種子 CK 在 0 s 處理 0 h 起始點時，滲漏電導度值為 19.00 ± 3.65 μS cm^{-1} (圖 7)。經過 HVEF 0.5 kV cm^{-1} 處理後，滲漏電導度值明顯上升，而在 1.0 kV cm^{-1} 處理則相反；當強度增加至 5.0 kV cm^{-1} 與 10.0 kV cm^{-1} 時，滲漏電導度值與 CK 之間無顯著差異，僅 10.0 kV cm^{-1} 60 s 處理時間滲漏電導度值仍然持續增加。‘A108’ 種子 CK 在 0 s 處理 0 h 起始點時，滲漏電導度值為 17.63 ± 1.65 μS cm^{-1}。經 HVEF 0.5 kV cm^{-1} 處理後，滲漏電導度值與 CK 之間無顯著差異，當強度增加至 1.0 kV cm^{-1} 後，滲漏電解值則顯著降低。以上這些 HVEF 的處理結果，可能與前述兩品種種子的種皮組織結構，以及不同 HVEF 的強度與時間所處理造成的種皮構造改變與破裂有關，也因此導致滲漏電導度值的變化。

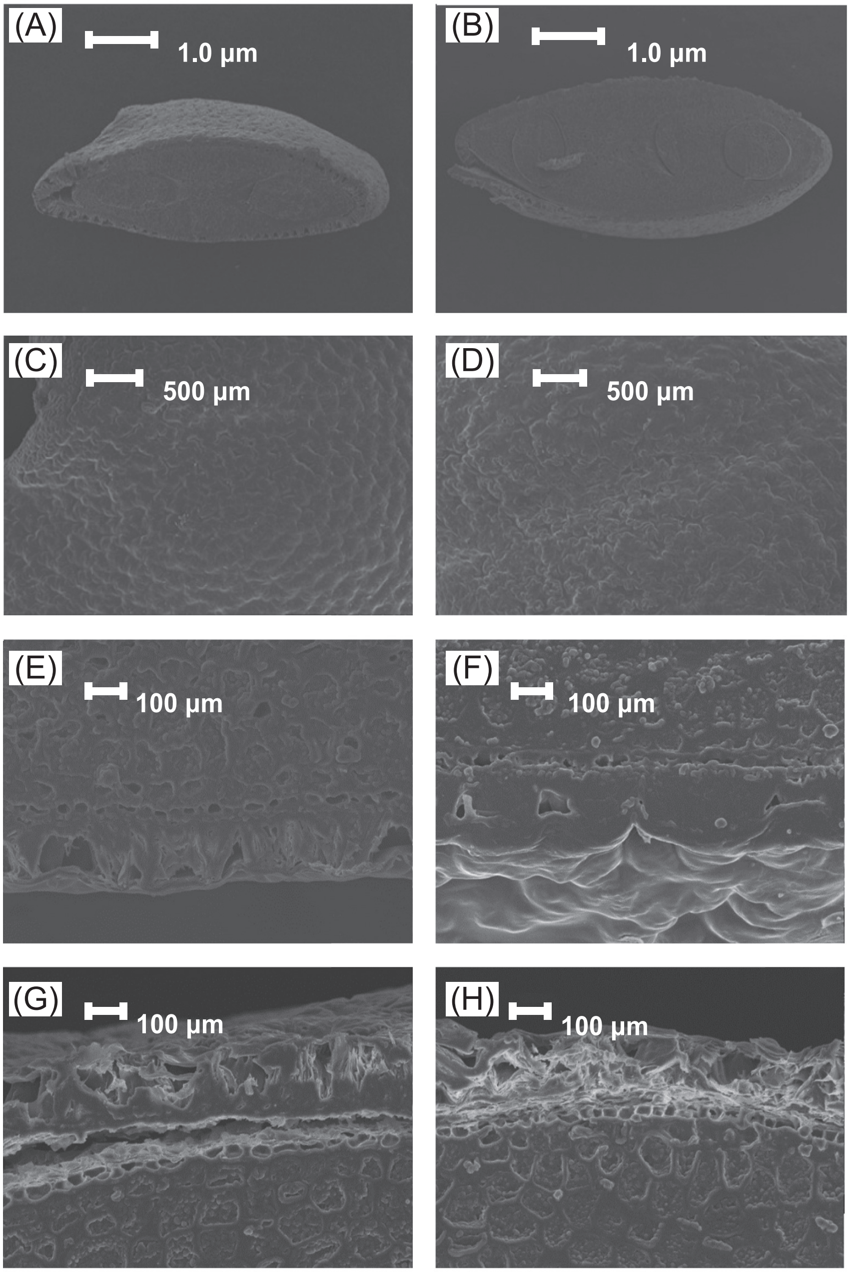


圖 2. 茄子品種 (A) ‘A105’ 與 (B) ‘A108’ 對照組種子之掃描式電子顯微鏡切面顯微組織照片 (15 kV, 40×) 與 (C) ‘A105’ 及 (D) ‘A108’ 對照組種子種皮之掃描式電子顯微鏡顯微組織照片 (15 kV, 70×)；(E) ‘A105’ 與 (F) ‘A108’ 對照組種子之掃描式電子顯微鏡縱切面顯微組織照片 (15 kV, 350×)，以及 (G) ‘A105’ 與 (H) ‘A108’ 浸潤處理種子之掃描式電子顯微鏡縱切面顯微組織照片 (15 kV, 350×)。

Fig. 2. The SEM photographs (15 kV, 40×) of seed section for control check (CK) of eggplant varieties (A) ‘A105’ and (B) ‘A108’ and their SEM photographs (15 kV, 70×) of seed coat (C for ‘A105’ and D for ‘A108’). The SEM photographs (15 kV, 350×) of longitudinal seed section for control check (CK) of eggplant varieties (E) ‘A105’ and (F) ‘A108’ and for those photographs (G for ‘A105’ and H for ‘A108’) taken after seed imbibition by scanning electron microscope (SEM).

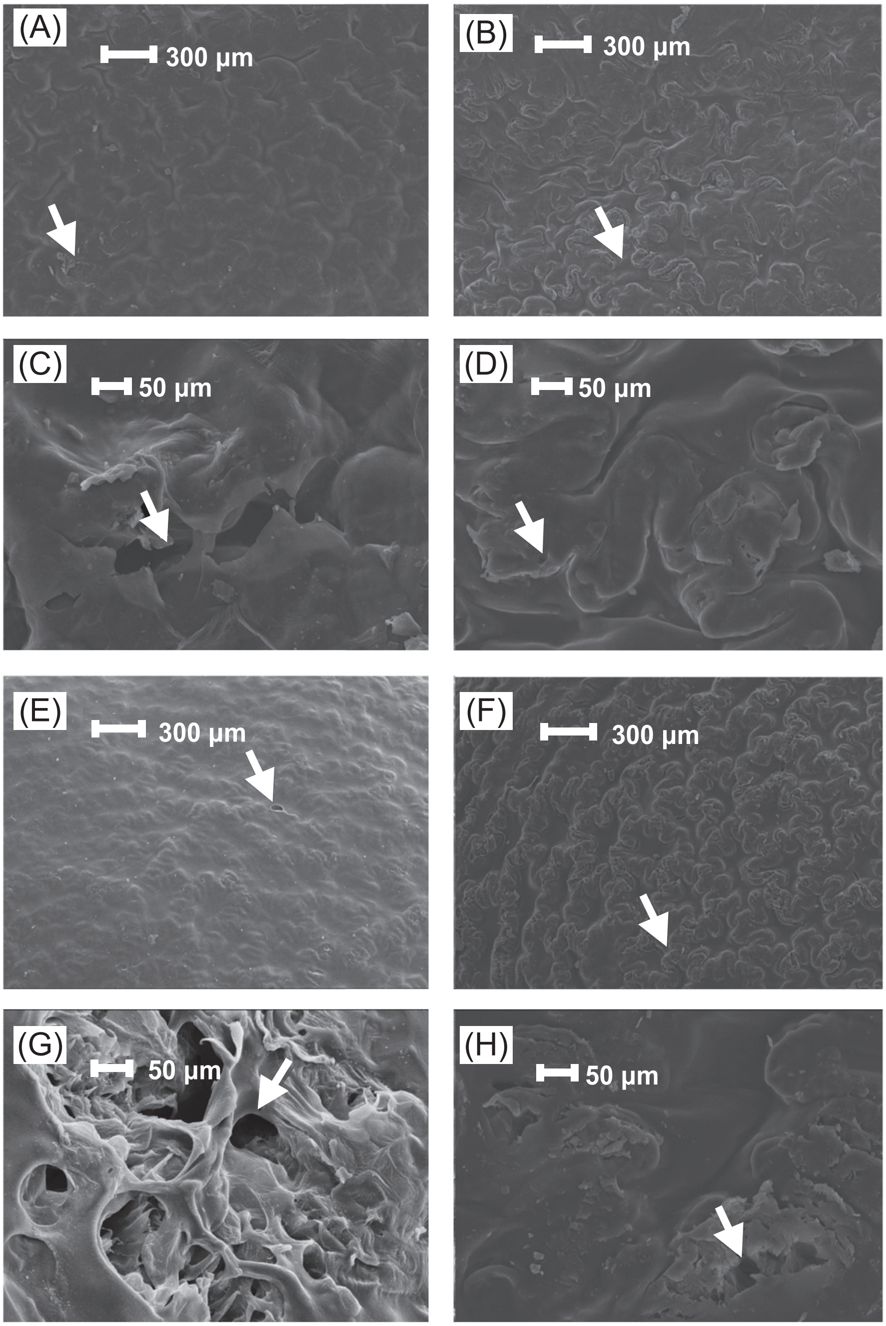


圖 3. 茄子品種種皮對照組掃描式電子顯微鏡顯微組織 (15 kV, 150×、700×) 之 (A、B) 'A105' 與 (E、F) 'A108' SEM 照片，與高壓靜電場 (HVEF) 0.5 kV cm^{-1} 600 s 處理種子種皮之掃描式電子顯微鏡顯微組織 (15 kV, 150×、700×) 之 (C、D) 'A105' 與 (G、H) 'A108' SEM 照片。白色箭頭處為種皮之破口。

Fig. 3. The SEM photographs (15 kV, 150×、700×) of seed coat for control check (CK) of eggplant varieties (A and B) 'A105' and (E and F) 'A108' and for those photographs (C and D for 'A105'; G and H for 'A108') treated with high-voltage electrostatic field (HVEF) at the intensity of 0.5 kV cm^{-1} 600 s by scanning electron microscope (SEM). The white arrows are the cracks of the seed coat.

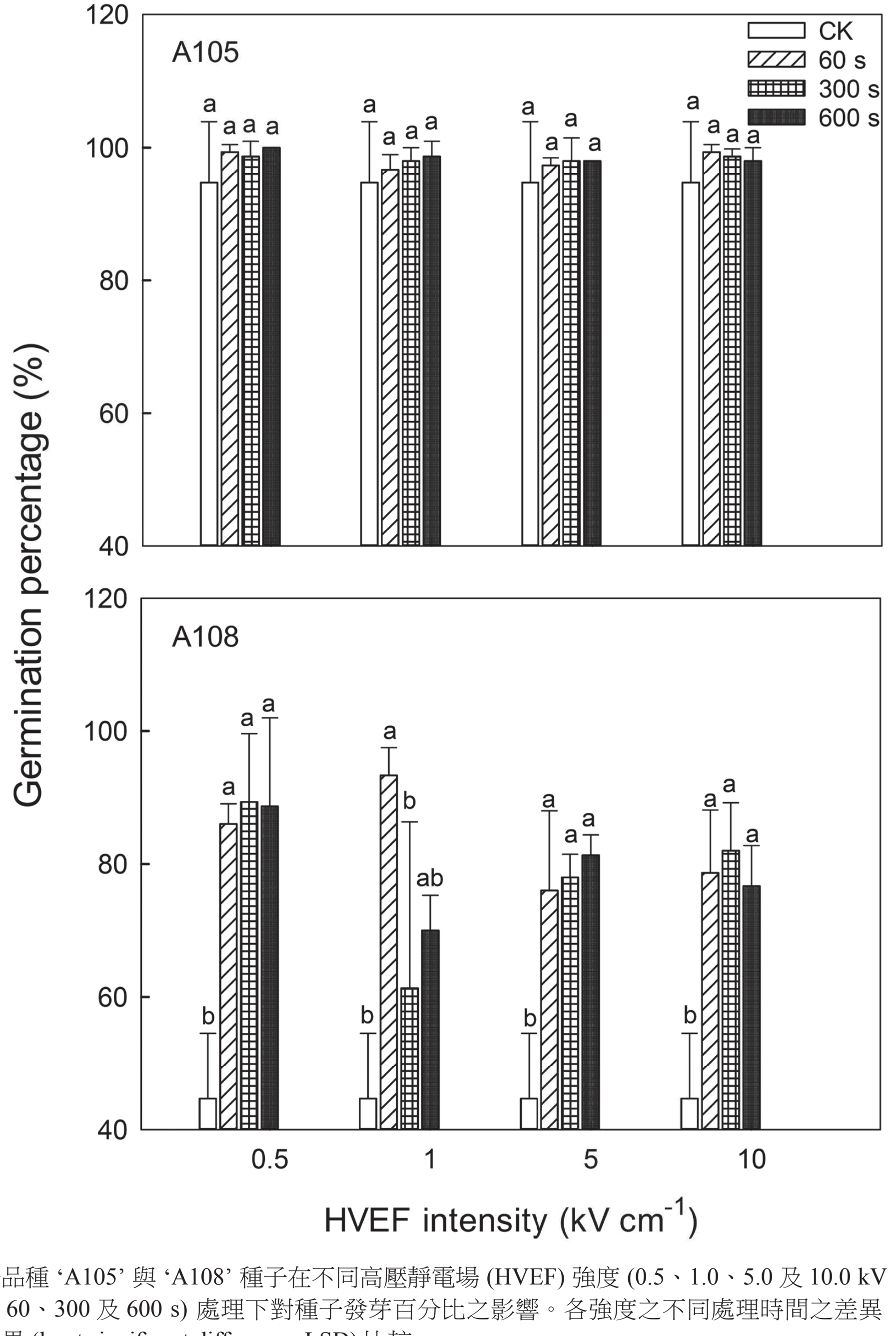


圖 4.　茄子品種 ‘A105’ 與 ‘A108’ 種子在不同高壓靜電場 (HVEF) 強度 (0.5、1.0、5.0 及 10.0 kV cm^{-1})，及不同時間 (0、60、300 及 600 s) 處理下對種子發芽百分比之影響。各強度之不同處理時間之差異，以 Fisher’s 最小顯著差異 (least significant difference; LSD) 比較。

Fig. 4.　Effects of different high-voltage electrostatic field (HVEF) intensities (0.5, 1.0, 5.0 and 10.0 kV cm^{-1}) and time of treatments (0, 60, 300, and 600 s) on the germination percentage of eggplant varieties ‘A105’ and ‘A108’. The difference between different treatment times of each intensity is compared with Fisher’s least significant difference (LSD).

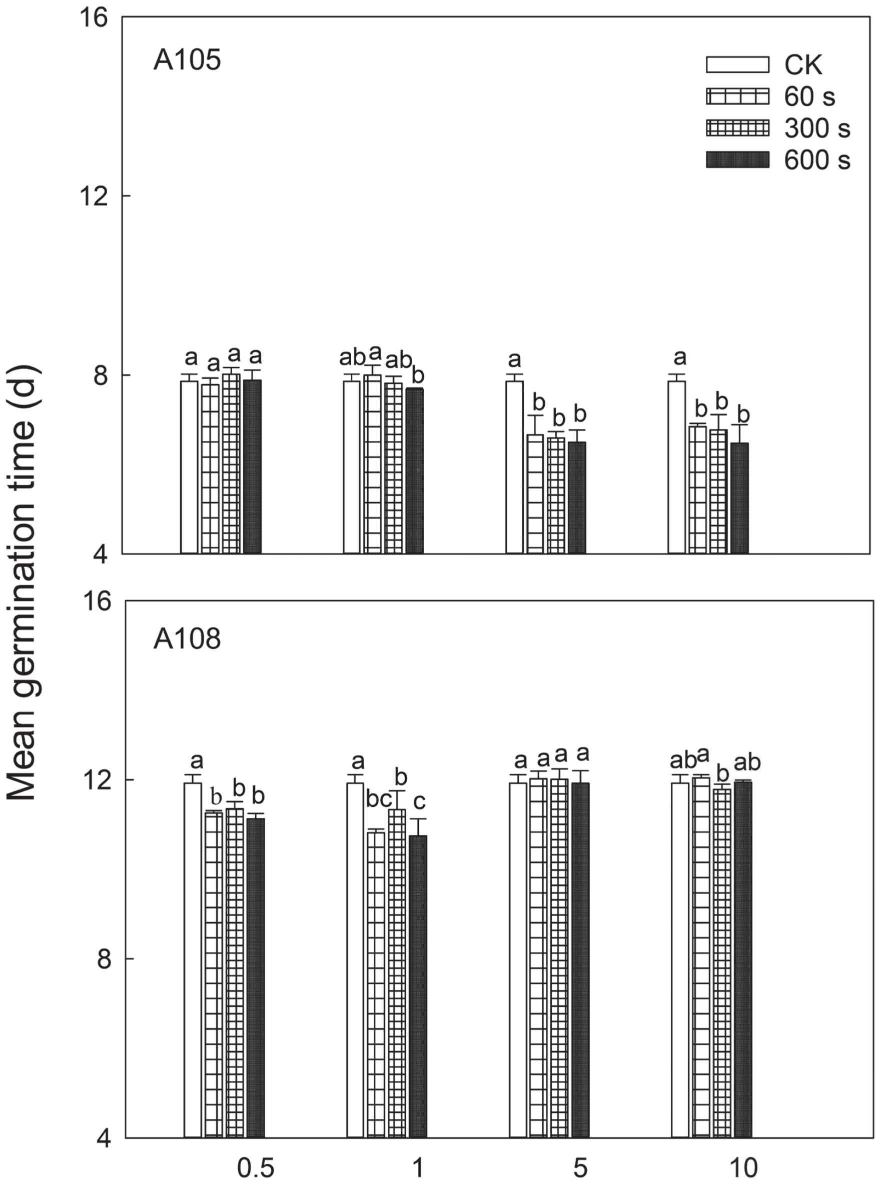


圖 5. 茄子品種 ‘A105’ 與 ‘A108’ 種子在不同高壓靜電場 (HVEF) 強度 (0.5、1.0、5.0 及 10.0 kV cm^{-1})，及不同時間 (0、60、300 及 600 s) 處理下對種子平均發芽時間之影響。各強度之不同處理時間之差異，以 Fisher’s 最小顯著差異 (least significant difference; LSD) 比較。

Fig. 5. Effects of different high-voltage electrostatic field (HVEF) intensities (0.5, 1.0, 5.0 and 10.0 kV cm^{-1}) and time of treatments (0, 60, 300, and 600 s) on the mean germination time of eggplant varieties ‘A105’ and ‘A108’. The difference between different treatment times of each intensity is compared with Fisher’s least significant difference (LSD).

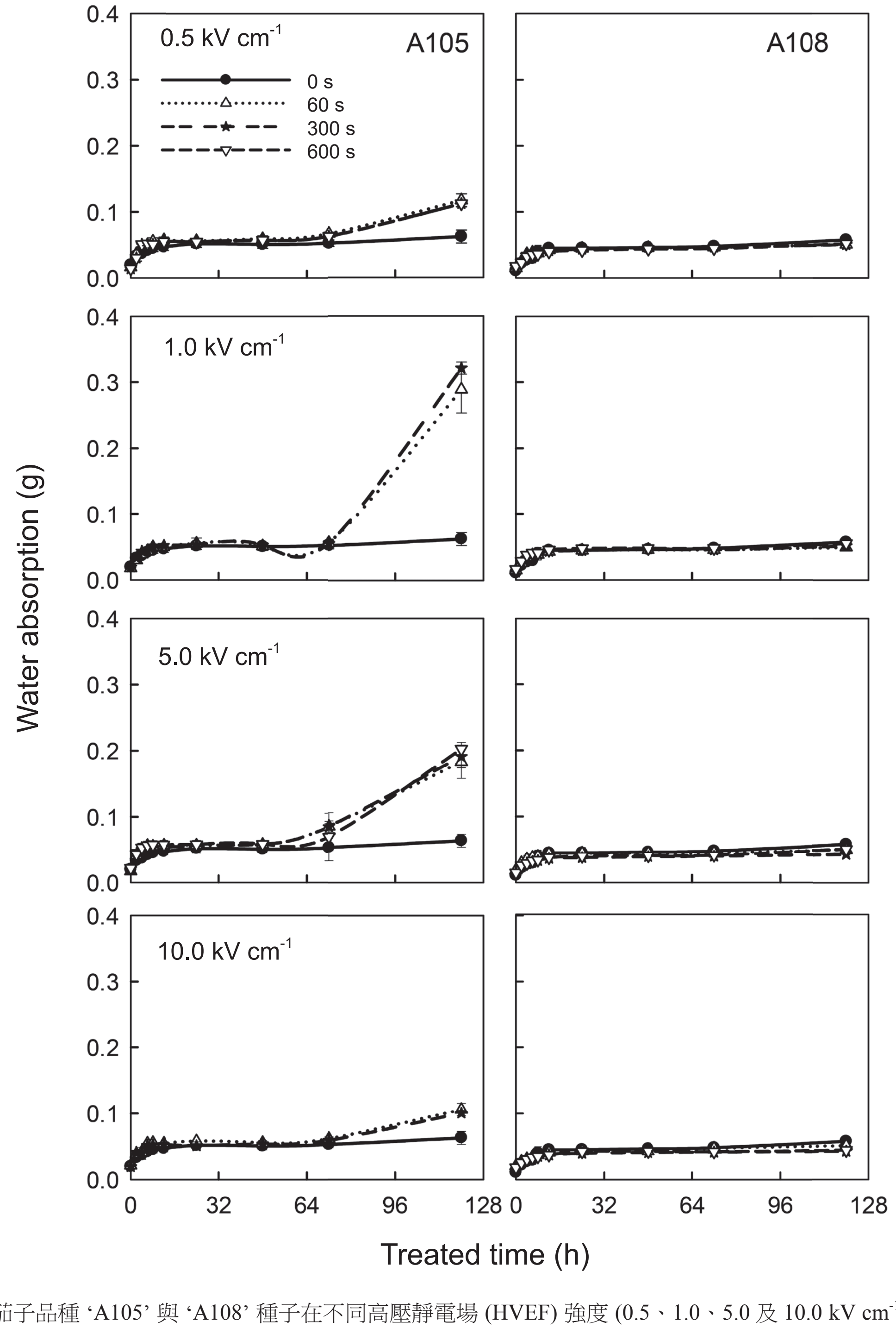


圖 6. 茄子品種 ‘A105’ 與 ‘A108’ 種子在不同高壓靜電場 (HVEF) 強度 (0.5、1.0、5.0 及 10.0 kV cm^{-1})，及不同時間 (0、60、300 及 600 s) 處理下對種子吸水速率之影響。CK：對照組 (●)；處理組 60 s (△)、300 s (★) 及 600 s (▽)。

Fig. 6. Changes in water absorption with treated time of eggplant varieties ‘A105’ and ‘A108’ under different high-voltage electrostatic field (HVEF) intensities (0.5, 1.0, 5.0 and 10.0 kV cm^{-1}) and time of treatments (0, 60, 300, and 600 s). CK: control check (●); time of HVEF treatments: 60 s (△), 300 s (★), 600 s (▽).

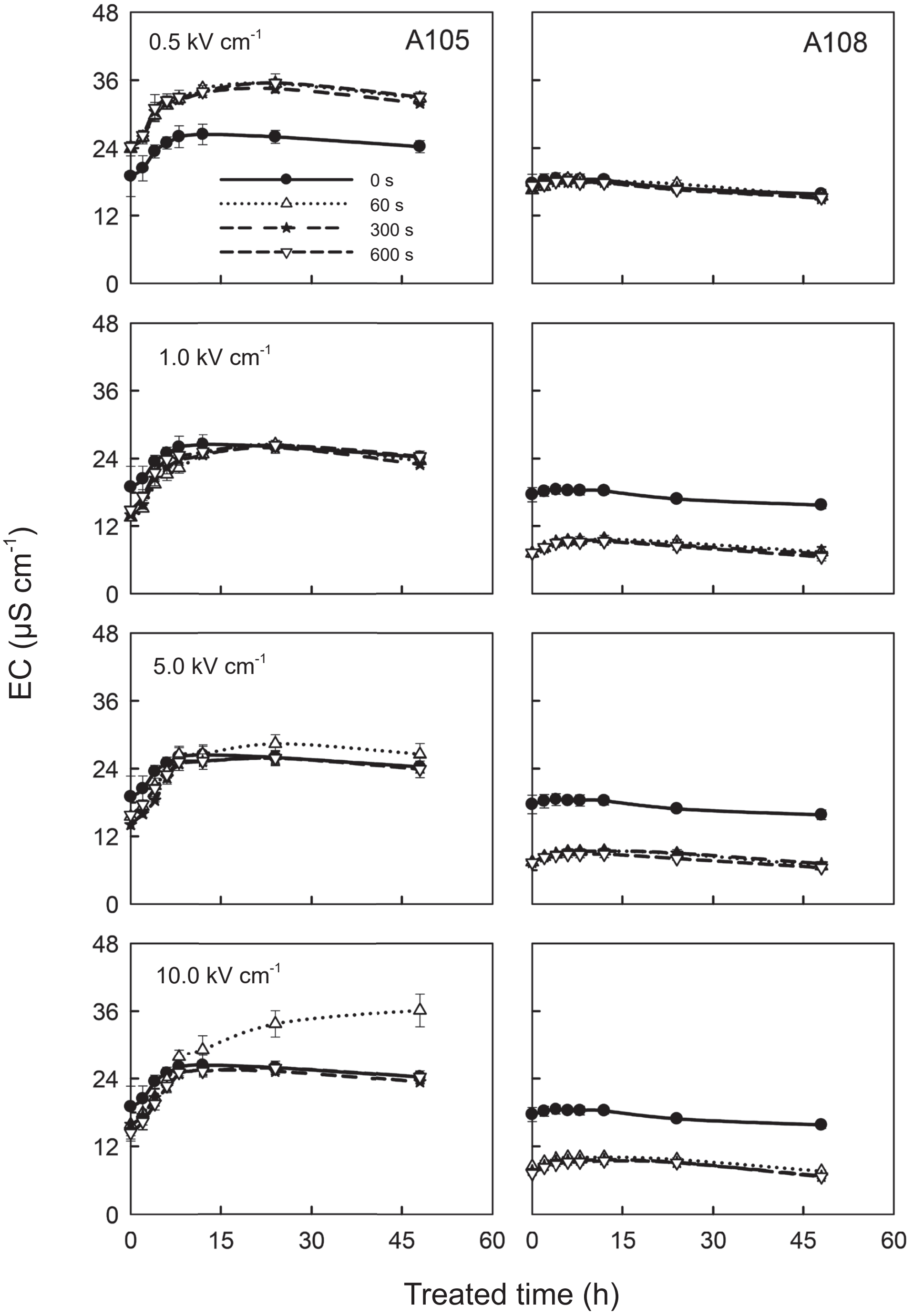


圖 7. 茄子品種 ‘A105’ 與 ‘A108’ 種子在不同高壓靜電場 (HVEF) 強度 (0.5、1.0、5.0 及 10.0 kV cm^{-1})，及不同時間 (0、60、300 及 600 s) 處理下對種子滲漏電導度之影響。CK：對照組 (●)；處理組 60 s (△)、300 s (★) 及 600 s (▽)。

Fig. 7. Changes in leakage electrical conductivity (EC) with treated time of eggplant varieties ‘A105’ and ‘A108’ under different high-voltage electrostatic field (HVEF) intensities (0.5, 1.0, 5.0 and 10.0 kV cm^{-1}) and time of treatments (0, 60, 300, and 600 s). CK: control check (●); time of HVEF treatments: 60 s (△), 300 s (★), 600 s (▽).

茄子品種 ‘A105’ 與 ‘A108’ 種子經過 HVEF 處理對可溶性蛋白質含量影響之比較

‘A105’ 與 ‘A108’ 種子經過 HVEF 處理後，將種子浸潤於 RO 水中，依 0、1、3、5 及 7 d 等不同日數取出樣品量測可溶性蛋白質含量。結果顯示，‘A105’ 之 CK 種子明顯低於處理組種子，經過 HVEF 處理後將更加快速誘導種子內蛋白質含量的增加 (圖 8)。而 ‘A108’ 種子內蛋白質曲線變化類似，CK 在第 0 日至第 3 日之測值皆低於處理組，直到第 5 日才有明顯的蛋白質含量上升，至第 7 日又迅速下降；惟經過 HVEF 處理後，第 1 日即見到蛋白質含量的增加，且隨著強度的增加蛋白質含量也隨之提升。比較兩品種種子內可溶性蛋白質曲線變化，發現相對於 ‘A105’ 種子，‘A108’ 種子內可溶性蛋白質含量在第 5 日後才快速的被誘導增加。

討論

如何提升種子發芽率、出苗一致及有效地縮短平均發芽時間，一直是專家學者們努力研究的課題。新的物理技術，包括超音波、鐳射、磁場、微波及 HVEF 等，因操作方便、效率高及成本低等優點，受到普遍歡迎與利用 (Ma *et al*. 2020)。本試驗經以 HVEF 處理砧木型茄子品種 ‘A105’ 與 ‘A108’ 種子後，發現 HVEF 將影響種子發芽行為並改變種子種皮外觀組織顯微結構，顯示此一技術可延用至茄子，而部分相關生理與形態機制之改變如下述。

茄子品種 ‘A105’ 與 ‘A108’ 種子發芽性狀及種皮組織顯微構造差異之比較

在不同種子類型的發芽過程中，使用掃描式電子顯微鏡 (SEM) 之顯微照片判識是一種很好的方法，可以顯示不同物種種子顯微結構的多樣性，並可透過觀察來瞭解有關不同種子類型形態進化與處理後變化的問題 (Weitbrecht *et al*. 2011)。本試驗在 ‘A105’ 與 ‘A108’ 種子試驗結果發現到，兩參試茄子品種之間存在發芽行為的顯著性差異，包括多項種子發芽性狀與種皮顯微構造上差異在內。透過 SEM 照片觀察，Ahmed & Fadl (2016) 提到茄科種子的外觀形態具有多樣變化，其中種皮的紋路與顯微細節在不同品種之間有很大差別。基本上 SEM 照片下觀察到 3 類不同的種子表面紋路，分為不規則的皺紋、網狀起伏不一及表面光滑；而且種子形狀通常為卵形或腎形，種子顏色介於黃色至棕色之間，種子質地一般都很粗糙。本試驗根據 SEM 照片形態觀察，發現與文獻所示的結構多有相似之處，‘A105’ 與 ‘A108’ 兩茄子品種種子之種皮有波浪狀光滑的表面，而且 ‘A108’ 品種種子的種皮有形態、波浪大小不一致的網狀圖案。由此推測，SEM 照片顯微構造上的不同，可能是造成兩個不同品種之間發芽行為明顯差異的主要原因之一。

茄子品種 ‘A105’ 與 ‘A108’ 種子 HVEF 處理效應差異之比較

由 Stolárik *et al*. (2015) 的試驗結果顯示，豌豆種子經 HVEF 處理後出現表面結構與種皮的改變，增加種子對水的吸收與滲透。本試驗利用 HVEF 處理 ‘A105’ 與 ‘A108’ 品種之種子後，相較於未處理的 CK，由 SEM 照片顯示經 HVEF 處理之種子種皮產生明顯的裂縫。其中，‘A105’ 品種在 HVEF 0.5 kV cm^{-1} 強度處理下，種皮呈現明顯寬鬆且規則的波浪狀，也出現顯而易見的種皮裂縫；而 ‘A108’ 品種的 CK 種皮則有較為緊密的波浪紋路，但是經 HVEF 10.0 $kVcm^{-1}$ 60 s 強度處理後，種皮形成明顯波浪狀壁與纖維狀裝飾物，且出現分散的裂縫。由此顯示，此兩品種種皮存在組織結構差異，經 HVEF 處理後雖有類似形態上的改變，品種間的差異依然存在。

本試驗又發現經 HVEF 處理後，種子發芽百分比的高低關鍵在於電場強度與處理時間，通常在低強度、長時間或是高強度、短時間下處理均發現有很好的效果，類似於 Aksenov *et al*. (2021) 之研究結果。茄子品種 ‘A105’ 種子經 HVEF 0.5 kV cm^{-1} 600 s 處理後，發芽百分比可達到 100%；而品種 ‘A108’ 種子以 1.0 kV cm^{-1} 60 s 處理下，發芽百分比可提升至 93.33%，相較於 CK 增加了 48.66%。由以

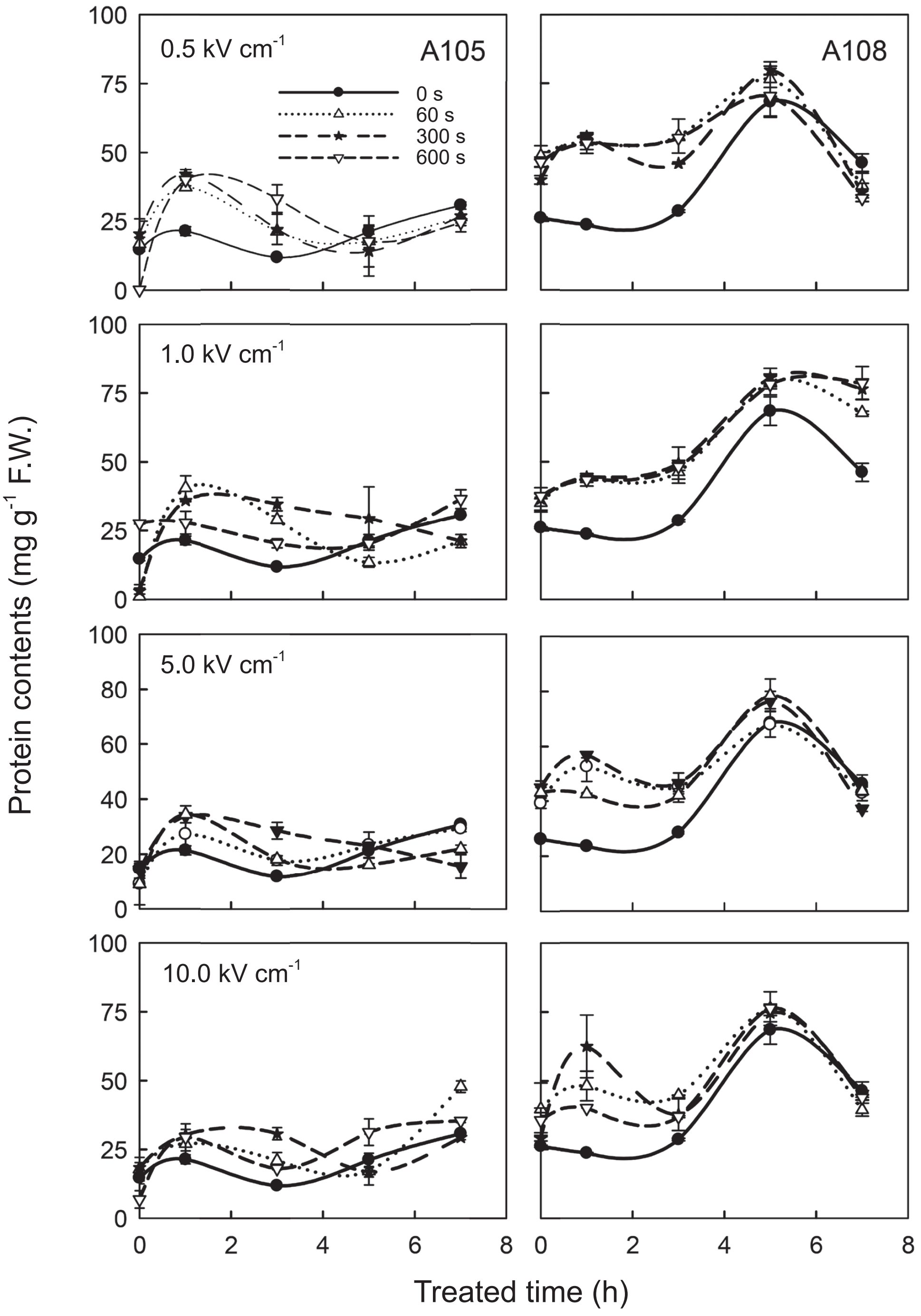


圖 8. 茄子品種 'A105' 與 'A108' 種子在不同高壓靜電場 (HVEF) 強度 (0.5、1.0、5.0 及 10.0 kV cm^{-1})，及不同時間 (0、60、300 及 600 s) 處理下對種子可溶性蛋白質含量之影響。CK：對照組 (●)；處理組 60 s (△)、300 s (★) 及 600 s (▽)。

Fig. 8. Changes in soluable protein content with treated time of eggplant varieties 'A105' and 'A108' under different high-voltage electrostatic field (HVEF) intensities (0.5, 1.0, 5.0 and 10.0 kV cm^{-1}) and time of treatments (0, 60, 300, and 600 s). CK: control check (●); time of HVEF treatments: 60 s (△), 300 s (★), 600 s (▽).

上結果可知，兩個品種在 HVEF 不同強度及時間處理下的效果也有所不同，Aksenov *et al*. (2021) 在高強度短時間或是低強度長時間下出現的處理結果，本試驗也有類似現象，但是不同茄子品種之最佳處理強度及處理時間有所不同。

此外，Meyer *et al*. (2007) 指出種子吸水有 3 階段，第一階段為乾種子快速吸水期；第二階段，隨種子浸潤吸水漸達飽和，吸水維持穩定而新陳代謝重新啟動，並誘導酶活性與蛋白質的合成；第三階段乃種子發芽後期，胚根細胞伸長與分裂後代謝基因的誘導，使得種子再次快速吸水而伸出種皮。Chiu (2022) 報告亦指出，花生種子 CK 第二階段吸水期為 36 h，經 HVEF 處理後 16 h 就有快速吸水之表現，而且有最高的吸水率，故推測 HVEF 處理可能會改變花生種子的親水能力，並提高其吸水率。本試驗經 HVEF 處理結果顯示，‘A105’ 茄子品種的種子在浸潤 72 h 後，出現第二波快速吸水現象，在 1.0 kV cm^{-1} 600 s 與 5.0 kV cm^{-1} 600 s 強度處理下，則有最大的吸水速率。‘A108’ 茄子品種的種子經過 HVEF 處理，在浸潤後 12 h 達到吸水飽和，24 h 後吸水速率未再有明顯變動，直到 120 h 才出現第二波快速吸水現象，但吸水波動幅度小於第一波。

由掃描式電子顯微鏡的 SEM 照片顯示，‘A105’ 與 ‘A108’ 茄子種子吸水表現的差異，可能由種皮的不同厚度與結構所造成，‘A105’ 品種之種皮較薄，經過 HVEF 處理後種皮即出現明顯裂縫情形，可能因此促使種子浸潤後可快速吸水；反之，‘A108’ 品種的 SEM 照片顯示具有較厚而細密的種皮，在 HVEF 處理下種皮破裂程度較低，可能因此導致種子較不易吸水，吸水速率相對較為緩慢。

茄子品種 ‘A105’ 與 ‘A108’ 種子經過 HVEF 處理對滲漏電導度影響之比較

由本試驗結果發現，茄子 ‘A105’ 品種的種子經過 HVEF 0.5 kV cm^{-1} 60–600 s 處理後，滲漏電導度值明顯高於 CK；隨著 HVEF 強度增加至 5.0 kV cm^{-1} 與 10.0 kV cm^{-1} 時，處理組之滲漏電導度值與 CK 差異不大，惟處理 60 s 的種子具有明顯較高的滲漏電導度值。在 ‘A108’ 品種的種子，無論 CK 或處理組，其滲漏電導度值概在浸潤後的 6–8 h 最高，隨後開始下降。以 0.5 kV cm^{-1} 與 1.0 kV cm^{-1} 處理，滲漏電導度值皆低於 CK，繼續增加 HVEF 的強度並未顯著提高滲漏電導度值。根據以上結果，在 HVEF 低強度與較短時間下，可以快速誘導溶質的大量滲漏，而隨著強度的增加與時間的延長，溶質的滲漏則相對被抑制。此現象與前人推論相符，適當的 HVEF 強度與時間處理雖可打破種子表皮細胞的細胞膜，促進種子快速吸水，然種子於萌發過程可快速修補細胞膜，而導致滲漏電導度值明顯下降。此外，據 Mitra *et al*. (2014) 指出細胞膜完整性的喪失也會導致滲漏電導度值的增加，因此不同物種種子在浸潤後，可能會有不同的細胞膜改變，有待進一步探討其原因。

茄子品種 ‘A105’ 與 ‘A108’ 種子經過 HVEF 處理對可溶性蛋白質含量影響之比較

本試驗 HVEF 係由導電電極之間的直流電勢差所引起的一種特殊情況，在暴露過程中電場的方向與大小不會改變 (Mamlić *et al*. 2021)。Aoki *et al*. (2006) 與 Scofield *et al*. (2007) 發現種子在發芽過程將會增加澱粉酶活性，以加速澱粉水解，並因此提高還原糖含量。在種子可溶性蛋白質含量部分，本試驗茄子 ‘A105’ 品種之種子經 HVEF 處理後，在浸潤 0、1、3、5 及 7 d 等不同日數後，取出樣品進行可溶性蛋白質分析，顯示出 CK 之含量低於處理組，而且經 HVEF 處理後可在第 1 日快速誘導可溶性蛋白質含量的增加到最大值，隨後就開始下降，直至第 5 日才有第二波的上升趨勢。由 ‘A108’ 品種之種子可溶性蛋白質變化曲線可知，CK 在第 0 日至第 3 日之數值皆低於處理組，直至第 5 日才有明顯可溶性蛋白質含量的提升，第 7 日則又迅速下降。然而，經過 HVEF 處理後，可溶性蛋白質含量在第 1 日即明顯增加，且隨強度的增加，可溶性蛋白質含量也隨之提升，第 3 日又有第 2 波的上升，至第 5 日才又下降，顯見 HVEF 處理具有誘導種子內可溶性蛋白質的效果。由此可見，HVEF 對於參試兩茄子品種皆有提前誘導種子內可溶性蛋白質的效果，

而此一結果可能有助於誘導發芽相關酵素的形成、活力的升高及水分的吸收，進而形成第 2 波的促進結果與發芽百分比的增加。這些種子可溶性蛋白質的變化，亦反應種子內部儲藏物質與滲漏率的改變，從種子貯藏的角度言之可視為種子品質的下降，但是可以促進種子發芽，而種子如未能及時發芽，則其發芽潛力將下降。

結論

本文據此試驗結果推測，種子種皮厚薄與組織結構上的不同，可能是造成參試 2 種茄子品種種子發芽性狀不一致的原因，間接影響種子的生理作用與發芽行為。兩品種種子種皮的厚度彰顯出種皮構造上的差異，從外觀組織顯微構造的 SEM 照片，可看出 'A105' 品種種子確實較 'A108' 品種薄且種皮較鬆散，因此 'A105' 品種較 'A108' 品種有較高的發芽百分比與較短的平均發芽時間。'A105' 品種之吸水率也有明顯快速吸水期之表現，'A108' 品種之吸水率則緩慢上升。再者，'A105' 品種之可溶性蛋白質含量也被快速誘導，在第 1 日即有快速上升之表現，而 'A108' 品種之可溶性蛋白質含量直至第 5 日才被大量誘導。綜合本試驗調查結果，顯示茄子種子品種間確實存在生理代謝與組織結構上的不同，且在發芽性狀上可看到明顯的差異性，而經過 HVEF 處理後，兩品種種子的處理效應不完全相同。據此，為期提高茄子種子之發芽表現，確有必要採取可行的方法/技術來促進種子發芽機制，以獲得較高發芽百分比與較整齊一致的種子發芽，以協助茄子種苗產業發展需求，而本試驗證明 HVEF 是一種可行的技術。

誌謝

本篇報告摘自第一作者陳怡菁碩士論文之一部分，論文試驗與撰寫期間承蒙明道大學智慧暨精緻農業學系邱凱瑩教授細心指導，特以誌謝。論文試驗資料分析及本篇報告之改寫獲楊純明客座教授/講座教授之啟發、督促及改正，提升報告論述邏輯使更為清晰明確，謹致由衷謝忱。

引用文獻

Ahmed, S. M. and M. A. Fadl. 2016. Genetic relatedness among *Solanum* L. species assayed by seed morphology and isozyme markers. Pak. J. Bot. 48:2011−2016.

Aksenov, M. P., N. Y. Petrov, T. V. Daeva, A. I. Belyaev, and A. M. Pugacheva. 2021. Sunflower yields increase by pre-sowing seed treatment in the electric field. IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 786:012001. doi:10.1088/1755-1315/786/1/012001

Aly, A. M., N. Eliwa, and M. H. AbdEl-Megid. 2019. Stimulating effect of gamma radiation on some active compounds in eggplant fruits. Egypt. J. Rad. Sci. Applic. 32:61−73. doi:10.21608/ejrsa.2019.10024.1066

Aoki, N., G. N. Scofield, X. D. Wang, C. E. Offler, J. W. Patrick, and R. T. Furbank. 2006. Pathway of sugar transport in germinating wheat seeds. Plant Physiol. 141:1255−1263. doi:10.1104/pp.106.082719

Bewley, J. D., K. J. Bradford, H. W. M. Hilhorst, and H. Nonogaki. 2013. Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy. 3rd ed. Springer. New York, NY. 392 pp. doi:10.1007/978-1-4614-4693-4

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248–254. doi:10.1006/abio.1976.9999

Chiu, K. Y. 2022. The changes in GABA, GAD and DAO activities, and microbial safety of soaking- and high voltage electric field-treated adzuki bean sprouts. Agriculture 12:469. doi:10.3390/agriculture12040469

Ellis, R. H. and E. H. Roberts. 1980. Improved equations for the prediction of seed longevity. Ann. Bot. 45:13–30. doi:10.1093/oxfordjournals.aob.a085797

Hu, J. F., Z. W. Zhang, H. L. Du, J. Z. Chen, and H. J. Wang. 2017. Effect of high voltage electric field on enzyme activity of sorghum seeds during the germination period. J. Henan Agric. Sci. 46(11):30−34. (in Chinese with English abstract) doi:10.15933/j.cnki.1004-3268.2017.11.006

Luo, S., H. Hu, L. Zhang, H. Zhou, and P. Li. 2017. Sugars in postharvest lotus seeds were modified by 6-benzylaminopurine treatment through altering related enzymes involved in starch-sucrose metabolism. Sci. Hortic. 221:73−82. doi:10.1016/j.scienta.2017.03.044

Ma. H., Z. Bian, and S. Wang. 2020. Effects of different treatments on the germination, enzyme activity, and nutrient content of buckwheat. Food Sci. Technol. Res. 26:319−328. doi:10.3136/fstr.26.319

Mamlić, Z. J., Z. T. Nikolić, G. S. Mamlić, G. D. Tamindžić, S. L. Vasiljević, S. M. Katanski, and A. L. Uhlarik. 2021. The influence of electric voltage on the germination of leguminous seeds. J. Agric. Sci. (Belgrade) 66:309−319. doi:10.2298/JAS2104309M

Marcos Filho, J. 2015. Seed Physiology of Cultivated Plants. 2nd ed. Abrates, Londrina. 660 pp.

Medeiros, M. A., S. B. Torres, M. Negreiros, and J. A. Madalena. 2015. Hidrocondicionamento e armazenamento de sementes de melão. Semin. Ciênc. Agrár. 36:57−66. (in Portuguese) doi:10.5433/1679-0359.2015v36n1p57

Meyer, C. J., E. Steudle, and C. A. Peterson. 2007. Patterns and kinetics of water uptake by soybean seeds. J. Exp. Bot. 58:717−732. doi:10.1093/jxb/erl244

Mitra, A., K. J. Flynn, J. M. Burkholder, T. Berge, A. Calbet, J. A. Raven, E. Granéli, P. M. Glibert, P. J. Hansen, D. K. Stoecker, F. Thingstad, U. Tillmann, S. Våge, S. Wilken, and M. V. Zubkov. 2014. The role of mixotrophic protists in the biological carbon pump. Biogeosciences 11:995–1005. doi:10.5194/bg-11-995-2014

Scofield, G. N., N. Aoki, T. Hirose, M. Takano, C. L. D. Jenkins, and R. T. Furbank. 2007. The role of the sucrose transporter, OsSUT1, in germination and early seedling growth and development of rice plants. J. Exp. Bot. 58:483−495. doi:10.1093/jxb/erl217

Singh, P., A. Chatterjee, V. Bhatia, and S. Prakash. 2020. Application of laser biospeckle analysis for assessment of seed priming treatments. Comput. Electron. Agric. 169:105212. doi:10.1016/j.compag.2020.105212

Stolárik, T., M. Henselová, M. Martinka, O. Novák, A. Zahoranová, and M. Černák. 2015. Effect of low-temperature plasma on the structure of seeds, growth and metabolism of endogenous phytohormones in pea (*Pisum sativum* L.). Plasma Chem. Plasma Process. 35:659−676. doi:10.1007/s11090-015-9627-8

Taiz, L. and E. Zeiger. 2002. Plant Physiology. 3rd ed. Sinauer Associates. Sunderland, MA. 690 pp. doi:10.1093/aob/mcg079

Weitbrecht, K., K. Müller, and G. Leubner-Metzger. 2011. First off the mark: Early seed germination. J. Exp. Bot. 62:3289−3309. doi:10.1093/jxb/err030

Wu, H. H., W. M. Sun, and H. Y. Chang. 2005. Effects of high voltage electrostatic field on biogicalo effect of plant. Heilongjiang Agric. Sci. 2:44−46. (in Chinese with English abstract)

Xiao, D. 2018. Study on pretreatment technology for eggplant seeds. Master Thesis. Northeast Agricultural University. Harbin, China. 68 pp. (in Chinese with English abstract)

Xu, W., Z. Song, X. Luan, C. Ding, Z. Cao, and X. Ma. 2019. Biological effects of high-voltage electric field treatment of naked oat seeds. Appl. Sci. 9:3829. doi:10.3390/app9183829

Yan, Y., S. Zhou, Z. Song, F. Li, C. Zhang, X. Zhang, and H. Song. 2017. Effects of frequency and voltage of high voltage pulsed electric field on improving vigor of aged cotton seed. Transac. Chinese Soc. Agric. Engineer. 33(13):310−314.

Effects of Different Intensities and Time Treatments of High-Voltage Electrostatic Field on the Seed Germination of Varied Varieties of Rootstock Eggplant

Yi-Jing Chen[1], Chwen-Ming Yang[2,3,4], and Kai-Ying Chiu[5,*]

Abstract

Chen, Y. J., C. M. Yang, and K. Y. Chiu. 2023. Effects of different intensities and time treatments of high-voltage electrostatic field on the seed germination of varied varieties of rootstock eggplant. J. Taiwan Agric. Res. 72(3):237–254.

The purpose of this study was to investigate the differences in germination behavior of rootstock-type eggplant varieties ‘A105’ and ‘A108’ at 15℃, including germination percentage, mean germination time, water absorption, leakage electrical conductivity and soluble protein content inside the seeds, as well as changes caused by high-voltage electrostatic field (HVEF) treatments. The results showed that there were differences between the two eggplant varieties in the above-mentioned traits, and the treatments with HVEF changed the germination behavior of the seeds. After seeds were treated with HVEF at 0.5 kV cm^{-1} for 600 s, the germination percentage of the ‘A105’ variety increased from 94.67% to 100%, and the mean germination time was significantly shortened from 7.86 d to 6.48 d after being treated with 10.0 kV cm^{-1} for 600 s. The water absorption showed a second wave of rapid water absorption after 72 h of imbibition. The leakage electrical conductivity value was significantly higher than that of the control check (CK) after treatment at 0.5 kV cm^{-1} for 60–600 s. The soluble protein content in the seeds of CK was lower than that of the HVEF treated seeds, indicating that HVEF treatments could rapidly induce the increase of the soluble protein content to the maximum on the first day. The germination percentage of variety ‘A108’ was greatly increased from 44.67% to 93.33% after being treated at 1.0 kV cm^{-1} for 60 s. The mean germination time was significantly shortened from 11.92 d to 10.82 d. The water absorption reached saturation 12 h after imbibition, and the second wave of rapid water absorption occurred until 120 h. Regardless of CK or treated seeds, the leakage electrical conductivity was the highest at 6–8 h after imbibition, and then began to decrease. With 0.5 kV cm^{-1} and 1.0 kV cm^{-1} treatments, the leakage electrical conductivities were lower than those of CK. Increasing the strength of HVEF did not significantly increase the conductivity. The soluble protein content in the seeds of CK was lower than that of the treated seeds from Day 0 to Day 3, and did not increase significantly until Day 5. Photographs taken by scanning electron microscope (SEM) revealed the differences in the thickness and microstructure of the seed coat of the two varieties. The microstructure of the seed coat of variety ‘A105’ was relatively loose with obvious cracks, while the seed coat of ‘A108’ was relatively dense with small cracks. Based on the experimental results, it is tempting to speculate that the differences in seed coat thickness and tissue microstructure may contribute to the inconsistent germination traits of the tested eggplant varieties, which indirectly affect the physiological processes and germination behavior of the seeds. In the case of inferior seed germination performance such as eggplant variety ‘A108’, using an appropriate HVEF treatment, it could effectively increase germination percentage, water absorption and leakage electrical conductivity, shorten the mean germination

Received: February 7, 2023; Accepted: April 29, 2023.
* Corresponding author, e-mail: cky@mdu.edu.tw
1 Project Assistant, Department of Smart and Quality Agriculture, MingDao University, Changhua County, Taiwan, ROC.
2 Visiting Professor, Department of Smart and Quality Agriculture, MingDao University, Changhua County, Taiwan, ROC.
3 Chair Professor, Department of Smart and Quality Agriculture, MingDao University, Changhua County, Taiwan, ROC.
4 Director, Smart Farming Research Center, MingDao University, Changhua County, Taiwan, ROC.
5 Professor, Department of Smart and Quality Agriculture, MingDao University, Changhua County, Taiwan, ROC.

time, and promote the early induction of soluble protein content in the seed, and then greatly improves the germination performance of the seeds.

Key words: Eggplant seed, Germination percentage, Mean germination time, Leakage conductivity, High-voltage electrostatic field.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 72(3):255–265 (2023)
DOI:10.6156/JTAR.202309_72(3).0005

研究報告

不等滲調處理濃度對不同品種砧木茄子種子在低溫發芽之影響

陳怡菁[1] 楊純明[2,3,4] 邱凱瑩[5,*]

摘要

陳怡菁、楊純明、邱凱瑩。2023。不等滲調處理濃度對不同品種砧木茄子種子在低溫發芽之影響。台灣農業研究 72(3):255–265。

前人研究顯示，生長調節劑或滲調化學物質，如水楊酸鹽 (salicylic acid; SA)，可利用於種子滲調處理，以提高發芽百分比與整齊度與縮短發芽所需時間，甚至於誘導產生耐抗生物性與生物性逆境之生長表現。本試驗即在於利用不等濃度 SA 溶液滲調處理砧木茄子 ‘A105’ 與 ‘A108’ 兩品種之種子，在 15℃低溫環境下探討其處理效果俾於未來應用。根據試驗結果，品種 ‘A105’ 在無 SA 處理下之對照組 (control check; CK) 種子發芽百分比 (germination percentage; GP) 達 98.67%，不等濃度 SA 溶液處理後未再顯著提高 GP。‘A108’ 品種之 CK 種子 GP 僅 74.67%，不等濃度 SA 溶液滲調處理後 GP 皆大幅提升，然處理濃度間無顯著差異。平均發芽時間 (mean germination time; MGT) 在兩品種皆因 SA 滲調處理有顯著縮短，‘A105’ 在 0.01 mM 濃度處理下由 CK 的 8.78 d 縮短為 5.72 d，‘A108’ 在 0.05 mM 處理下由 CK 的 11.99 d 縮短為 8.97 d。‘A105’ 無論是否滲調處理，種子在浸水後即快速吸水 (water absorption; WA) 直至 12 h 達到飽和點，各種滲調處理與 CK 之間在前 72 h 未有顯著差異，且至 72 h 後皆有第二波快速吸水量現象。‘A108’ 亦在約 12 h 達到飽和點，然各滲調處理與 CK 之間未有差異，且直至 120 h 仍未出現顯著第二波快速吸水。‘A105’ 之 CK 種子滲漏電導度值 (electrical conductivity; EC) 在浸水後快速升高，經 SA 處理後則明顯降低。‘A108’ 之 CK 種子在浸水後的 EC 緩慢上升，至 6 h 後就開始下降，經 SA 處理後的 EC 幾乎皆高於 CK。‘A105’ 之 CK 種子可溶性蛋白質 (soluble protein; SP) 含量在浸水第 1 日後即明顯增加，第 3 日起又有第二波的上升，滲調處理之種子則可緩升直至第 7 日。‘A108’ 之 CK 種子 SP 在浸潤後 1 d 才開始增加，直至第 7 日，經 SA 處理後則可在第 1 日內即快速增加，隨後緩升至第 7 日。綜合試驗結果，SA 滲調處理對於參試茄子品種之種子發芽有正面促進效果，包括提高 GP、縮短 MGT、加快 WA、酌予降低滲漏 EC 及增加 SP 等性狀，然而品種間表現存在差異。

關鍵詞：滲調處理、水楊酸、砧木茄子、種子發芽、低溫。

前言

由於果實含有豐富的營養物質，包括碳水化合物、蛋白質、礦物質及低度熱量，茄子 (*Solanum* spp.) 受到世界各地消費者普遍的歡迎，栽培分布廣泛 (Xiao 2018)，為全球第五大重要經濟茄科作物，次於馬鈴薯、番茄、胡椒及煙草，年產 5,200 萬公噸以上，尤以亞洲地區的生產面積最高 (Aly *et al*. 2019)。依農業部農業統計年報顯示，台灣 2021 年茄子栽植面積為 1,323 ha，生產量為 35,344 Mg，種苗需求近 55 kg (https://agr.afa.gov.tw/afa/afa_

收件日期：2023 年 2 月 13 日；接受日期：2023 年 5 月 3 日。
* 通訊作者：cky@mdu.edu.tw
1 明道大學智慧暨精緻農業學系計畫專任助理。台灣 彰化縣。
2 明道大學智慧暨精緻農業學系客座教授。台灣 彰化縣。
3 明道大學智慧暨精緻農業學系講座教授。台灣 彰化縣。
4 明道大學智慧農業研究中心主任。台灣 彰化縣。
5 明道大學智慧暨精緻農業學系教授。台灣 彰化縣。

frame.jsp)。為期產量與品質的不斷提升，茄子植株初期的健康生長乃重要基石，因此業者莫不積極致力於生產優良品質種子與健壯種苗，同時謀求搭配的種子處理技術來提高種子發芽比例與苗株活力 (Medeiros *et al*. 2015)，尤其處於相對的逆境情況 (如低溫或高溫)。

茄子烹煮的餐食在台灣受到許多民眾喜愛，成為夏秋季的重要蔬菜之一，同時也是可作為砧木之茄科作物。由於生長季節常有低溫情境，性喜溫暖氣候的茄子處於低於 15℃的逆境時，會產生發芽障礙徵狀 (如水分吸收遲緩、發芽與出苗緩慢、發芽不整齊及成苗率降低等)，甚至產生畸型苗或降低幼苗生長 (Marcos Filho 2015)。除上述秋冬季情形外，台灣高溫多濕的夏季亦易引發青枯病，使得種苗品質不良而影響幼株生長。據此，可提高發芽表現與活力的種子處理方法，常為研究主題與業者殷切需求的技術。

萌發是種子生命週期中初始的重要過程，係一系列複雜的生理與生化現象，依照種子遺傳組成、周遭環境及栽培管理而有不同的發芽行為，甚至於受到當批種子活力、溫度及時間等因素影響。常用促進種子發芽的滲調處理 (osmoregulation or osmotic treatment) 屬於添加滲調物質的化學性處理，在於維持穿過生物體細胞膜鹽分與水分平衡之溶質調節 (osmotic adjustment)，包含水、電解質及非電解質分子在內，進而調節種子生理代謝機能而有助於發芽 (Bewley 1997; Paparella *et al*. 2015)。通常滲調處理多在適當溫度與濕度條件讓種子吸收水分，種子內細胞經水合的物理過程後，生理生化機制被誘導，代謝活性增加，然而可逆的發芽觸發卻被隨後的乾燥處理抑制 (Hussain *et al*. 2016)。仍然存活的乾燥種子蓄勢待發，可在不久之後的有利環境下重新水合並開始發芽 (Heydecker & Gibbins 1978; Singh *et al*. 2020)。經過特殊滲調物質處理的種子，則可能在較短時間內吸收水分，提前完成發芽歷程 (Heydecker & Gibbins 1978; Bewley 1997; Singh *et al*. 2020)。滲調另可誘導細胞膜的修補作用，細胞膜對生物生長甚為重要，受到損害時易導致細胞物質滲漏，藉由滲調處理則可修復細胞膜、延緩細胞膜老化、提高種子活力及萌發 (Wojtyla *et al*. 2016)。

滲調處理功效可能與蛋白質、植物激素 (如赤黴素、乙烯及生長素)、非酶促過程、種子年齡、種子大小及種子的結構成分影響等因子有關 (Balestrazzi *et al*. 2011; Uçarlı 2020)。但是，種子滲調處理受多種因素影響，諸如種子類型、種子含水量、溫度、光照、水合持續時間、處理劑量、通風及乾燥等方式；而誘導種子發芽的條件，則包含滲透劑、溶液的滲透勢、溫度、時間及溶液通氣性等 (Uçarlı 2020)。Ruttanaruangboworn *et al*. (2017) 指出不同濃度硝酸鉀溶液之滲調處理，對種子吸脹與萌發模式產生影響，同時觀察到由於滲透勢降低到一定程度會限制種子的吸水能力，從而對發芽所需養分的提供產生不利影響，阻礙種子吸收而導致發芽時間增加。Lee *et al*. (2016) 以 15% 濃度的聚乙二醇滲調處理茄子種子 3 d，有效提高種子發芽勢、發芽率及平均發芽時間；若以 10.0 μg mL^{-1} 水楊酸處理龍鬚菜 (*Gracilariopsis lemaneiformis*)，則可有效提高其生長速率，比對照組增加了 34.0%。滲調處理常用於洋蔥、芹菜及番茄等不同的蔬菜種子，可提高種子的整體發芽特性 (Paparella *et al*. 2015)；且在逆境下，種子經滲調處理的效果更為顯著 (Ibrahim 2016)。

水楊酸 (salicylic acid; SA) 是一種天然、水溶性且非酶型之酚類抗氧化劑，也是一種植物激素。其通過形態、生理及生化機制，具有參與植物防禦各種生物與非生物逆境的重要作用，而且作為重要的信號分子，SA 亦可調節植物對於包括鹽度在內的非生物逆境反應 (Farooq *et al*. 2013; Umebese & Bankole 2013; Azeem *et al*. 2019)。Arfan *et al*. (2007) 指出 SA 涉及養分吸收與轉運、水分與氣孔調節以及抗氧化防禦，可作為內源性植物生長調節劑，對植物生長、植物的根系及發育均有促進作用。目前研究顯示，SA 對小麥幼苗的碳水化合物含量具顯著影響，促使植物的多醣與可溶性糖含量增加 (Luo *et al*. 2014)。在鹽分逆境下，植物通過有機酸 (如 SA、抗壞血酸及檸檬酸) 誘導蛋白酵素增加游離氨基酸含量，使蛋白質含量下降，有助於耐鹽機制與改善鹽害的影響 (Agati & Tattini 2010; Ali *et al*. 2012; Umebese & Bankole 2013; Azeem *et al*. 2019)，亦

可提高代謝效率或直接作用於代謝途徑，從而適應非生物逆境 (Agostini *et al*. 2013)。Aly *et al*. (2019) 指出使用 SA 可改變各種生理功能，來增強茄子的種子發芽與幼苗活力。Habibi (2012) 發現施用 500 μM SA，可減輕水分逆境對大麥植物的影響。但是，SA 卻會阻礙西瓜種子的發芽，延長種子的發芽時間與幼苗生長 (Silva *et al*. 2014)。

為利於在地茄子產業的持續發展，本試驗以 SA 為滲調物質來究明使用於茄子種子的可行性與合適的處理方法。試驗採用砧木型茄子種子為材料，經以 SA 不同濃度與時間處理後置於 15℃低溫環境，以調查種子萌發情形與處理效果，並探討多項種子生理反應之改變。

材料與方法

本試驗之砧木型茄子 ‘A105’ 與 ‘A108’ 品種種子購自瑞成種苗有限公司 (台灣台中市)，將種子分置入聚乙烯 (polyethylene) 夾鏈袋後包裹於牛皮紙袋內，並保存於 4℃冰箱待用。種子在發芽試驗前，先進行種子的滲調處理。

種子滲調處理

從 4℃冰箱中取出預先準備之試驗種子，以 SA 溶液進行浸潤處理，溶液分為 0.01、0.05、0.1 及 0.5 mM 等 4 種不等濃度，每處理 3 重複，每重複 50 粒種子，另以未做任何 SA 處理為對照組 (control check; CK)。由於預備試驗中發現 ‘A105’ 種子浸潤超過 6 h 即發芽，而 ‘A108’ 種子在超過 48 h 以後才會發芽，因此將 ‘A105’ 種子浸潤時間設定為 6 h，‘A108’ 種子浸潤時間設定為 48 h。處理組種子經 SA 溶液處理後，以逆滲透 (reverse osmosis; RO) 水清洗，再移入 35℃烘箱予 48 h 回乾，以此經過回乾的種子，作為後續發芽試驗的材料。

種子發芽試驗

以前述經過不等 SA 濃度處理過的回乾種子為發芽試驗處理組，未做任何 SA 處理的種子為對照組 (CK)，合計 5 種處理進行發芽試驗。每種處理 50 粒種子，3 重複。採紙間法實施發芽試驗，以 2 層濾紙 (Advantec 定性濾紙，1 號，90 mm；Advantec, Tokyo, Japan) 為發芽介質，將種子置於其上，然後再於上方覆蓋 1 層濾紙，加入適量的 RO 水，以保持飽和濕度。將置於發芽皿浸潤之種子，置於 15℃恆溫生長箱 (LBR-575, LIAN SHAN, Biological Trading, Taichung, Taiwan)，觀察與調查以下各項種子發芽性狀，並逐一記錄。

發芽百分比 (germination percentage; GP)

在 14 d 內逐日調查 15℃恆溫生長箱中發芽期間的發芽種子總數 (X)，計算 X 占發芽處理種子總數 (N) 之百分比 (%)，公式：$GP = (X/N) \times 100\%$。

平均發芽時間 (mean germination time; MGT)

將各日數記載之發芽種子數與日數以 Ellis & Roberts (1980) 之公式計算平均發芽時間，單位為日 (day; d)，公式：$MGT = \Sigma fn/N$。其中，f：播種後第 d 日發芽種子數，n：播種後之日數，N：發芽處理之種子總數。

吸水量 (water absorption; WA)

各種處理另取 20 粒種子，3 重複，秤其原始重量 (W0) 後，以濾紙作為浸潤介質加入 RO 水進行浸潤。經過不同時間下取出浸潤種子，秤其每次時間取出的種子重量 (Wi)，扣除浸潤前的種子原始重量後，估算單位時間內的吸水含量 (g)，並將不同時間之水分含量 (Wn) 變化繪製成曲線圖，公式：$Wn = Wi - W0$。

滲漏電導度 (electrical conductivity; EC)

各種處理另取 20 粒種子，3 重複，量測滲漏 EC。將 20 粒種子置於離心管中加入 20 mL 的 RO 水，在 25℃浸水，經過不同時間 (0、2、4、6、8、12、24 及 48 h) 以電導度計 (Horiba LAQUA DS-71, The Labware House, New Plymouth, New Zealand) 讀取其 EC 值 (μS cm^{-1})。

可溶性蛋白質 (soluble protein; SP) 測定

種子 SP 含量之測定參考 Bradford (1976) 之方法，取 5 粒種子以 2 mL 磷酸鈉緩衝液 (sodium phosphate buffer, 50 mM, pH 6.8) 研磨均質。在 4℃下以 5,550 ×*g* 離心 20 min。取 20 μL 之上清液注入試管，加入 5 mL 蛋白質

染劑染料鈉 (dye sodium)，震盪均勻後靜置約 10 min。再以分光光度計 (T60 spectrophotometer, PG Instruments, Lutterworth, UK) 測定 595 nm 波長之吸光值。標準曲線之製作，係取小牛血清蛋白 (bovine serum albumin; BSA) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) 1 mg 溶於 1 mL RO 水作為標準樣品，再於試管中各分別添加 10、30、50 及 70 µL 之不同量標準樣品，然後讀取位於 595 nm 之吸光值繪製。

本試驗利用預備試驗結果，特別選用發芽表現存有差異的 2 種砧木茄子品種 'A105' 與 'A108' 參試。試驗數據之統計分析，係使用統計分析軟體 Minitab 19.0 Statistical Software (Minitab, State College, PA, USA)。發芽試驗各調查性狀 (參數) 之操作實用性評估，先分別進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)，若不同濃度 SA 處理間差異顯著，再以最小顯著差異 (Fisher's Least Significant Difference; LSD) 檢定法比較各處理時間平均值之差異，統計顯著性以 $P < 0.05$ 為標準。科學統計繪圖軟體 SigmaPlot 14.0 版 (Systat Software, San Jose, CA, USA) 則使用於統計繪圖。

結果與討論

不等 SA 酸濃度之滲調處理對種子 GP 與 MGT 之影響

當種子播種或育苗前，為期打破休眠或使其發芽整齊，經常選用生長調節劑 (如激勃素) 或滲調化學物質 (如 SA 或亞磷酸鉀) 施予滲調處理，以提高種子的 GP 與整齊度並縮短發芽所需時間，甚至於誘導產生植物對抗入侵的病原菌與增強植株防病能力 (Ibrahim 2016; Wojtyla *et al*. 2016; Zhang *et al*. 2017)。滲調處理亦可促進種子發芽與對逆境的耐受性，滲調回乾貯藏時間雖然有長有短，但種子仍保存滲調處理所誘發的反應能力，可在未來發芽時與幼苗階段表現 (Wojtyla *et al*. 2016)。

本研究利用 SA 滲調處理砧木茄子 'A105' 與 'A108' 兩品種之種子，以調查對種子發芽行為的促進效果。根據試驗結果，茄子品種 'A105' 種子之 CK 的 GP 高達 98.67%，經過不等 SA 濃度溶液處理後，0.01 mM 濃度處理可進一步增加 0.66%，惟與 CK 相較並無顯著差異。'A108' 之 CK 的 GP 僅有 74.67%，經過 4 種不等 SA 濃度溶液滲調處理後，GP 比皆顯著提升，然不等處理濃度之間無顯著差異 (圖 1)。

在 MGT 的試驗結果，'A105' 品種之 CK 種子為 8.78 d，經滲調處理可顯著縮短 MGT，尤以 0.01 mM 濃度處理有最短 GMT 為 5.72 d。'A108' 品種之 CK 種子 GMT 為 11.99 d，在 0.05 mM 處理下之 MGT 縮短為 8.97 d (圖 1)。由此顯示 SA 的滲調處理具有縮短發芽時間效果，然品種間表現存有差異。

在各種化學方法中，滲調處理應用在種子發芽上，以不同方法、時間及溶液濃度處理所得到的結果不盡相同。SA 歸屬於植物生長調節劑，為一種天然酚類化合物，可利用於調控植物對各種非生物性逆境的耐受能力，然而隨著滲調浸種或植株葉面噴施等不同處理方法，在調控種子萌發、植株生長及對逆境 (如低溫與鹽分) 耐受性等方面可能會有不同結果。根據本試驗結果，茄子 'A105' 品種之種子 GP 在處理組與 CK 之間無顯著差異；而 'A108' 品種之種子則在處理組與 CK 之間呈現較大差別，顯示低發芽百分比之 'A108' 品種，對於 SA 的滲調處理有明顯促進反應。然而，由於不同濃度 SA 之間未有差異，其對於 'A108' 之 GP 促進效果是否在於水分子，或僅需低濃度之 SA 即可達到相當的發芽促進，則可於未來進一步探討。

'A105' 之種子 MGT 在 0.01 mM 低濃度下有最佳的效果，但 MGT 隨著濃度上升反而被延長；'A108' 之種子亦在 0.05 mM 較低濃度下達到最短 MGT (圖 1)。因此，參試兩茄子品種之種子，在浸潤於較低濃度的 SA 中，可獲得較短的 MGT，這可能是由於在低濃度下有利於種子水合與萌發的啟始，促使種子可以快速發芽而縮短 MGT。當濃度太高時，由於滲透勢 (osmotic potential) 下降而影響種子吸水力，從而導致發芽延遲與 MGT 延長。

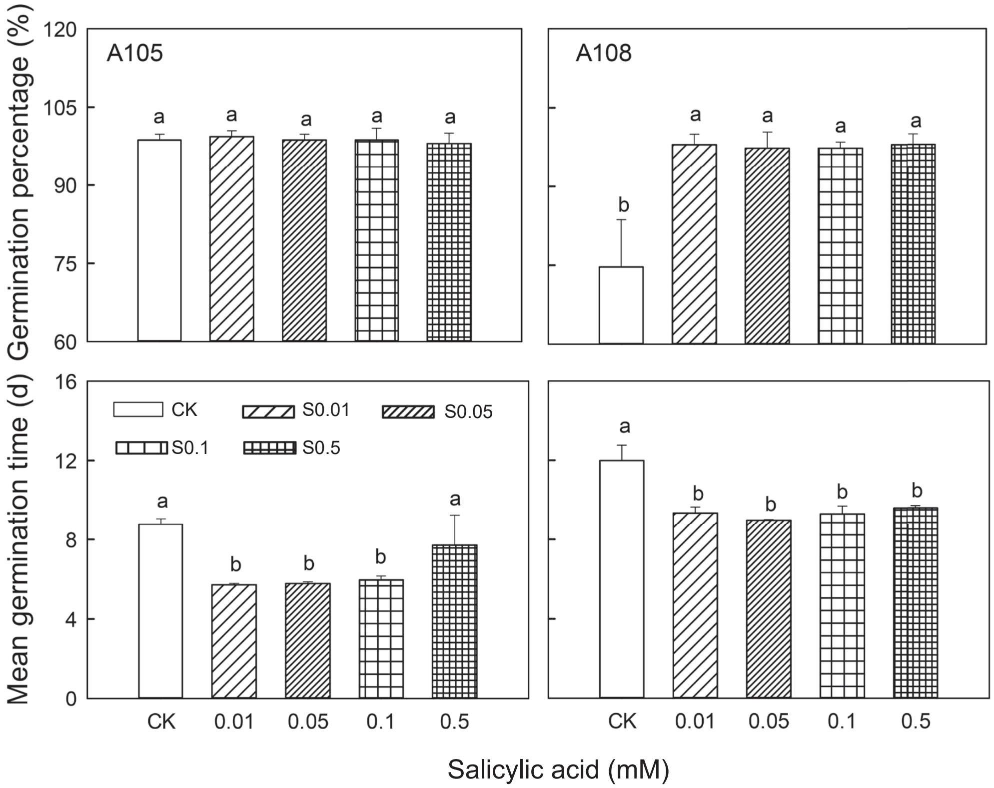


圖 1. 砧木茄子品種 ‘A105’ 與 ‘A108’ 種子，在水楊酸 (salicylic acid; SA) 滲調處理濃度 0.01、0.05、0.1 及 0.5 mM 下，對種子發芽百分比與平均發芽時間之影響。CK (對照組)、水楊酸濃度 0.01 mM (S0.01)、0.05 mM (S0.05)、0.1 mM (S0.1) 及 0.5 mM (S0.5)。當不同濃度 SA 溶液處理單因子變異數分析 (ANOVA) 有顯著差異時，繼而進行 SA 處理之間的最小顯著差異 (LSD) 檢定。

Fig. 1. Effects of osmotic treatments with different of concentrations of salicylic acid at 0.01, 0.05, 0.1 and 0.5 mM on seed germination percentage and mean germination time of rootstock eggplant cultivars ‘A105’ and ‘A108’. CK, control check; salicylic acid concentrations, S0.01–0.01 mM, S0.05–0.05 mM, S0.1–0.1 mM, and S0.5–0.5 mM. When there were significant differences in one-way analysis of variance (ANOVA) of different concentrations of SA solutions, the least significant difference (LSD) test between SA treatments was then carried out.

Singh (2020) 亦指出以 NaCl 滲調處理鷹嘴豆時，在較低濃度與短時間處理下可增加種子吸水率 (量)，其原因係因滲透調節能力的提升與代謝物質的啟動。然而，當滲透勢低於一定程度時，則會限制種子吸水能力，從而導致吸水時間增加。本試驗有類似結果，故欲以化學物質 (如 SA) 溶液進行滲調處理時，宜釐清適當的濃度，才能有效改善種子發芽，成為方便、快速及低成本的種子滲調處理技術。在過氧化氫 (H_2O_2) 的研究上，雖然是一種具有腐蝕性的化合物，惟如以適當濃度處理種子，可增加種皮的通透性而提升種子的呼吸強度、酵素的活性，加速種子內部生理生化反應，從而促進種子內含物質的代謝並提高種子萌發 (Zhang *et al*. 2017)。

不等 SA 濃度之滲調處理對種子 WA 與滲漏 EC 之影響

試驗發現高 GP 的 ‘A105’ 品種種子，無論是否滲調處理，種子在浸水後即快速吸水直至 12 h 達到飽和點，而且各種滲調處理與 CK 之間在前 72 h 未有顯著差異；至 72 h 後，滲調處理與 CK 之種子皆有第二波快速吸水現象發生，然滲調處理種子有較高的 WA。‘A108’

品種之種子 WA 在滲調處理與 CK 之間未有差異，皆在約 12 h 達到飽和點，然直至 120 h WA 仍未出現第二波快速吸水 (圖 2)。

在滲漏 EC 的試驗結果上，‘A105’ 種子之 CK 測值在浸水後快速升高，顯示種子內部溶質快速滲漏出來；然而相較於 CK，經過 SA 酸滲調處理之種子滲漏 EC 值明顯的降低。‘A108’ 種子之 CK 在浸水後的滲漏 EC 值緩慢上升，至 6 h 後就開始下降；經過 SA 滲調處理後，各種處理之滲漏 EC 值幾乎皆高於 CK，僅 0.5 mM 濃度處理的滲漏 EC 值低於 CK，直到 24 h 後才緩慢提升 (圖 2)。

一般乾燥的種子在有利條件下接觸水分時，水分可快速滲入種子內部，此時期種皮滲透性係大多數種子是否能夠有效吸水的核心，不同種皮形態將有不同的發芽特徵。當吸水率與種子大小的變化開始停滯時，發芽的種子就會進入吸水的下個階段，此期間水分含量維持穩定，但持續時間可能有很大差別 (Weitbrecht *et al*. 2011)。本試驗的 ‘A105’ 品種種子在浸潤後，無論是否滲調處理，種子即快速吸水至 12 h 達到飽和點，且在 72 h 出現第二波快速吸水現象；但 ‘A108’ 品種種子之 WA，在滲調處理與 CK 之間未有顯著差異，又在 12 h 達到飽和點，且至 120 h 仍未出現第二波快速吸水。據此推測，參試兩茄子品種的 WA 差別，最可能原因在於種皮構造上的差異所致 (Chen *et al*. 2023)，‘A105’ 種子的種皮厚度與組織

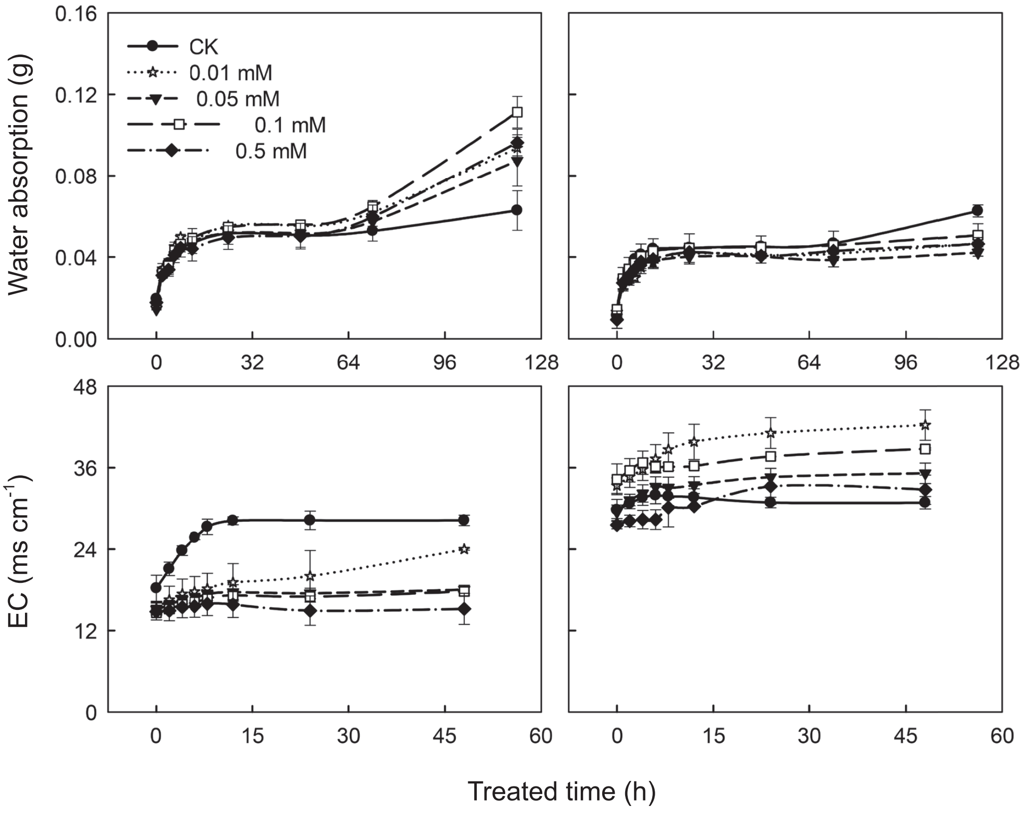


圖 2.　砧木茄子品種 ‘A105’ 與 ‘A108’ 種子，在水楊酸滲調處理濃度 0.01、0.05、0.1 及 0.5 mM 下，對種子吸水量 (WA) 與滲漏電導度 (EC) 之影響。CK：對照組 (●)；水楊酸不同濃度分為 0.01 mM (☆)、0.05 mM (▼)、0.1 mM (□) 及 0.5 mM (◆)。

Fig. 2.　Effects of osmotic treatments with different of concentrations of salicylic acid at 0.01, 0.05, 0.1 and 0.5 mM on water absorption (WA) and leakage electrical conductivity (EC) of rootstock eggplant cultivars ‘A105’ and ‘A108’. CK, control check; salicylic acid concentrations, S0.01–0.01 mM, S0.05–0.05 mM, S0.1–0.1 mM, and S0.5–0.5 mM.

細密度可能低於‘A108’種子，使其種子能夠快速吸收水分而利於發芽與縮短發芽時間。

在油菜種子的研究發現，滲調處理對 2 個油菜品種種子發芽與幼株生長造成影響，可增加活性氧 (reactive oxygen species; ROS) 酵素的產生 (Zhang *et al*. 2017)。在乾旱逆境下，由於生物膜調節離子運輸能力的喪失，造成大豆種子的電解質滲漏增加，滲調處理透過提高膜穩定性而有助於膜修復系統，使得萌發的種子具有較低的 EC 值 (Chowdhury *et al*. 2017)。Shan *et al*. (2021) 試驗以聚乙二醇作為滲調溶劑，發現可加速種子膜系修復並降低吸脹作用，從而保護細胞膜系統抑制快速吸水造成的膜破裂，減少物質滲漏、提高種子發芽率與活性，並增加抗逆性。Weitbrecht *et al*. (2011) 指出，種子最初的吸水通常伴隨著細胞溶質的大量滲漏，雖然滲漏可降低種子內的抑制物質濃度來加速發芽，卻也快速進行水合作用導致膜與細胞受損的徵狀。本試驗在品種‘A105’種子發現，CK 的滲漏 EC 值在浸潤後快速升高，顯示種子內部溶質快速滲漏出來，經過水楊酸滲調處理之種子滲漏 EC 值則明顯的降低。在品種‘A108’種子，CK 浸水後的滲漏 EC 值緩慢上升，至 6 h 就開始下降；經過 SA 滲調處理後，滲漏 EC 值皆比 CK 高，僅 0.5 mM 濃度處理的滲漏 EC 值低於 CK，直到 24 h 後才緩慢提升。由此現象再次推測，‘A108’種子可能具有較厚的種皮與較細密的種皮組織，使其滲漏 EC 值與發芽表現皆低於‘A105’種子。

不等 SA 濃度之滲調處理對種子 SP 含量之影響

茄子品種‘A105’CK 之種子 SP 在浸水第 1 日後即明顯增加，第 3 日起又有第二波的上升；經滲調處理之種子 SP 含量在第 1 日亦快速升高，隨後呈現緩慢上升趨勢直至第 7 日。‘A108’種子之 CK 的 SP 在浸潤後 1 d 才開始增加，直至浸潤後第 7 日；經過不等濃度 SA 溶液處理後，種子 SP 在第 1 日內即快速增加，隨後緩慢的上升至第 7 日，尤其以 0.01 mM 濃度有較高的上升幅度 (圖 3)。

種子儲存的蛋白質，係種子在形成過程中合成的，作為未來種子發芽過程中需用的硫與氮的營養來源，它們的積累根據土壤中養分的可用性而變化 (Tabe *et al*. 2002; Shaban 2013)。經過 SA 滲調處理的種子，不僅誘導幼苗中磷 (P) 含量的增加，在種子滲調期間還可觀察到 α-澱粉酵素活性與糖含量之間存在顯著的正相關性 (Farooq *et al*. 2013)。在小麥種子的 SA 滲調試驗結果顯示，1.0 mM 濃度處理的發芽率優於 0.5 mM 濃度，另可有效提高總葉綠素、蛋白質、酚類及可溶性糖，而且在鹽分逆境下經 SA 滲調處理可以有效提高發芽率。Farooq *et al*. (2013) 指出，SA 會誘導發芽種子中的代謝與生化反應變化，包括營養同化物的水解與滲調萌發或激活打破休眠相關的酵素在內。

本試驗將茄子品種‘A105’種子經過不等濃度 SA 滲調處理後，發現 CK 之 SP 含量在第 7 日出現高峰值，滲調處理之 SP 含量則在第 1 日快速上升，隨後呈現平穩緩升直至第 7 日。品種‘A108’種子經過不等濃度 SA 滲調處理後，以濃度 0.1 mM 與 0.5 mM 處理的 SP 含量緩步上升，至第 3 日達到最大高峰值，隨後即漸次下降。其餘濃度處理與 CK 則先快速上升至第 3 日，然後平緩增加到第 7 日。由此顯示，茄子品種間之種子 SP 含量對於不等濃度 SA 的滲調處理存在差異反應，‘A105’之種子對於 0.05 mM 以上之 SA 濃度處理反應較佳；‘A108’之種子 SP 含量則在 0.01 mM 低濃度 SA 處理下有較快速的增加。

結論

生長調節劑或滲調化學物質 (如水楊酸鹽) 常被利用於種子的滲調處理，以提高 GP 與整齊度並縮短發芽所需時間，甚至於誘導產生耐抗生物性與生物性之生長表現。本研究利用不等 SA 酸溶液滲調處理茄子‘A105’與‘A108’兩品種之種子，發現品種‘A105’種子之 CK 的 GP 已高達 98.67%，因此經過不等 SA 濃度溶液處理後，未再顯著提高發芽百分比。品種‘A108’種子之 CK 的 GP 僅有 74.67%，經過本試驗不等 SA 濃度溶液滲調處理後，GP 皆大幅提升，然不等處理濃度之間無顯著差

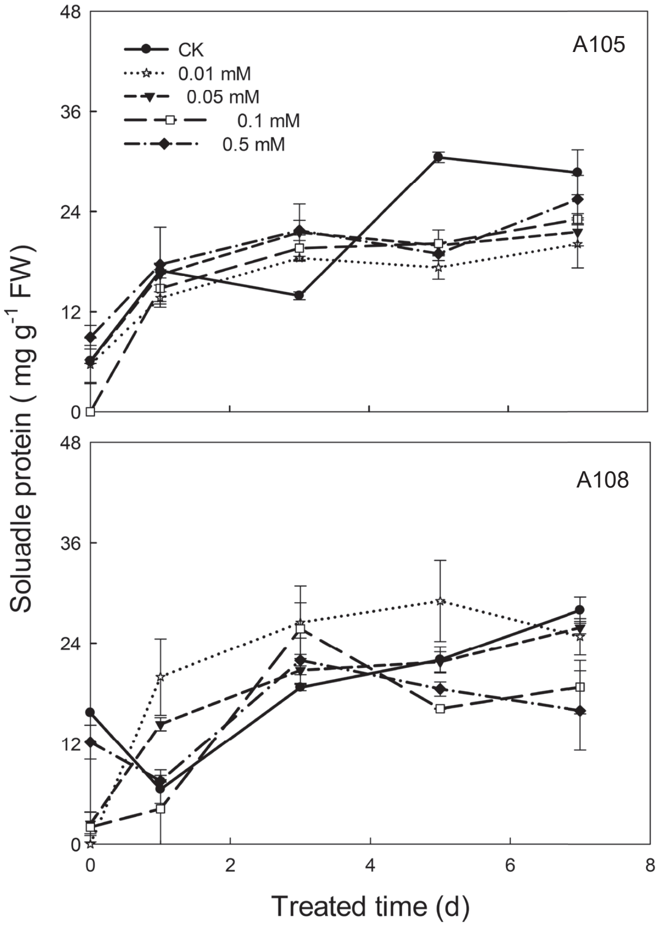


圖 3. 砧木茄子品種 'A105' 與 'A108' 種子，在水楊酸滲調處理濃度 0.01、0.05、0.1 及 0.5 mM 下，對種子可溶性蛋白質含量之影響。CK：對照組 (●)；水楊酸不同濃度分為 0.01 mM (☆)、0.05 mM (▼)、0.1 mM (□) 及 0.5 mM (◆)。

Fig. 3. Effects of osmotic treatments with different of concentrations of salicylic acid at 0.01, 0.05, 0.1 and 0.5 mM on seed soluble protein content of rootstock eggplant cultivars 'A105' and 'A108'. CK, control check; salicylic acid concentrations, S0.01–0.01 mM, S0.05–0.05 mM, S0.1–0.1 mM, and S0.5–0.5 mM.

異。MGT 在兩品種皆因為 SA 的滲調處理而有顯著縮短，'A105' 在 0.01 mM 濃度處理下由 CK 的 8.78 d 縮短為 5.72 d，'A108' 在 0.05 mM 處理下由 CK 的 11.99 d 縮短為 8.97 d，顯示品種間存有差異。'A105' 無論是否滲調處理，種子在浸水後即快速吸水直至 12 h 達到飽和點，各種滲調處理與 CK 之間在前 72 h 未有顯著差異，且至 72 h 後皆有第二波快速 WA 現象。'A108' 亦在約 12 h 達到飽和點，然各滲調處理與 CK 之間未有差異，惟直至 120 h WA 仍未出現第二波快速吸水。'A105' CK 之種子滲漏 EC 值在浸水後快速升高，經 SA 滲調處理則明顯的降低。'A108' CK 在浸水後的種子滲漏 EC 值緩慢上升，至 6 h 後就開始下降，經過 SA 滲調處理後滲漏 EC 值幾乎皆高於 CK。'A105' CK 之種子 SP 在浸水第 1 日後即明顯增加，第 3 日起又有第 2 波的上升，滲調處理之種子則可緩慢上升直至第 7 日。'A108' CK 之 SP 在浸潤後 1 d 才開始增加，直至浸潤後第 7 日，經不等濃度 SA 溶液處理後則可在第 1 日內即快速增加，隨後緩慢的上升至第 7 日。綜合試驗結果，SA 溶液的

滲調處理確實對於參試茄子品種之種子發芽有正面促進效果，包括提高 GP、縮短 MGT、加快 WA、酌予降低滲漏 EC 值及增加 SP 含量等性狀。然而，品種間表現存在差異，推測肇因於種皮厚度與組織細密程度，如本系列研究 Chen *et al*. (2023) 試驗結果所揭示原因。

引用文獻

Agati, G. and M. Tattini. 2010. Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. New Phytol. 186:786–793. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03269.x

Agostini, E. A. T., N. B. Machado-Neto, and C. C. Custódio. 2013. Induction of water deficit tolerance by cold shock and salicylic acid during germination in the common bean. Acta Scientiarum Agron. 35:209–219. doi:10.4025/actasciagron.v35i2.15967

Ali, A., N. Iqbal, F. Ali, and B. Afzal. 2012. *Alternanthera bettzickiana* (Regel) G. Nicholson, a potential halophytic ornamental plant: Growth and physiological adaptations. Flora. 207:318–321. doi:10.1016/j.flora.2011.12.002

Aly, A. M., N. Eliwa, and M. H. AbdEl-Megid. 2019. Stimulating effect of gamma radiation on some active compounds in eggplant fruits. Egypt. J. Rad. Sci. Applic. 32:61−73. doi:10.21608/ejrsa.2019.10024.1066

Arfan, M., H. R. Athar, and M. Ashraf. 2007. Does exogenous application of salicylic acid through the rooting medium modulate growth and photosynthetic capacity in two differently adapted spring wheat cultivars under salt stress? J. Plant. Physiol. 164:685–694. doi:10.1016/j.jplph.2006.05.010

Azeem, M., M. Qasim, M. W. Abbasi, Tayyab, R. Sultana, M. Y. Adnan, and H. Ali. 2019. Salicylic acid seed priming modulates some biochemical parameters to improve germination and seedling growth of salt stressed wheat (*Triticum aestivum* L.). Pak. J. Bot. 51:385–391. doi:10.30848/PJB2019-2(1)

Balestrazzi, A., M. Confalonieri, A. Macovei, and D. Carbonera. 2011. Seed imbibition in *Medicago truncatula* Gaertn: Expression profiles of DNA repair genes in relation to PEG-mediated stress. J. Plant Physiol. 168:706–713. doi:10.1016/j.jplph.2010.10.008

Bewley, J. D. 1997. Seed germination and dormancy. Plant Cell 9:1055–1066. doi:10.1105/tpc.9.7.1055

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248–254. doi:10.1006/abio.1976.9999

Chen, Y. J., C. M. Yang, and K. Y. Chiu. 2023. Effects of different intensities and time treatments of high-voltage electrostatic field on the seed germination of varied varieties of rootstock eggplant. J. Taiwan Agric. Res. 72:237–254. (in Chinese with English abstract)

Chowdhury J. A., M. A. Karim, Q. A. Khaliq, A. U. Ahmed, and A. M. Mondol. 2017. Effect of drought stress on water relation traits of four soybean genotypes. SAARC J. Agric. 15(2):163–175. doi:10.3329/sja.v15i2.35146

Ellis, R. H. and E. H. Roberts. 1980. Improved equations for the prediction of seed longevity. Ann. Bot. 45:13–30. doi:10.1093/oxfordjournals.aob.a085797

Farooq, M., M. Irfan, T. Aziz, I. Ahmad, and S. A. Cheema. 2013. Seed priming with ascorbic acid improves drought resistance of wheat. J. Agron. Crop Sci. 199:12–22. doi:10.1111/j.1439-037X.2012.00521.x

Habibi, G. 2012. Exogenous salicylic acid alleviates oxidative damage of barley plants under drought stress. Acta Biol. Szeged. 56:57–63.

Heydecker, W. and B. M. Gibbins. 1978. Attempts to synchronise seed germination. Acta. Hortic. 72:79–92. doi:10.17660/ActaHortic.1978.72.8

Hussain, S., F. Khan, H. A. Hussain, and L. Nie. 2016. Physiological and biochemical mechanisms of seed priming-Induced chilling tolerance in rice cultivars. Front. Plant Sci. 7:116. doi:10.3389/fpls.2016.00116

Ibrahim, E. A. 2016. Seed priming to alleviate salinity stress in germinating seeds. J. Plant Physiol. 192:38–46. doi:10.1016/j.jplph.2015.12.011

Lee, T., H. Liu, H. Gi, Y. Chang, and L. Chu. 2016. Effects of osmotic priming with PEG on seed vigor and seedling physiological characteristics in eggplants. J. Agric. Univ. Hebei 39:14–18. (in Chinese with English abstract) doi:10.13320/j.cnki.jauh.2016.0052

Luo, Y. L., Z. L. Su, T. J. Bi, X. L. Cui, and Q. Y. Lan. 2014. Salicylic acid improves chilling tolerance by affecting antioxidant enzymes and osmoregulators in sacha inchi (*Plukenetia volubilis*). Braz. J. Bot. 37:357–363. doi:10.1007/s40415-014-0067-0

Marcos Filho, J. 2015. Fisiologia de Sementes de Plantas Cultivadas. 2nd ed. Abrates. Londrina, Brazil. 660 pp. (in Portuguese)

Medeiros, M. A, S. B. Torres, M. Z. Negreiros, and J. A. Madalena. 2015. Hydropriming and storage of melon seeds. Sem. Cienc. Agrar. 36:57–66. (in Portuguese with English abstract) doi:10.5433/1679-0359.2015v36n1p57

Paparella, S., S. S. Araújo, G. Rossi, M. Wijayasinghe, D. Carbonera, and A. Balestrazzi. 2015. Seed priming: State of the art and new perspectives. Plant Cell

Rep. 34:1281–1293. doi:10.1007/s00299-015-1784-y

Ruttanaruangboworn, A., W. Chanprasert, P. Thobunluepop, and D. Onwimol. 2017. Effect of seed priming with different concentrations of potassium nitrate on the pattern of seed imbibition and germination of rice (*Oryza sativa* L.). J. Integr. Agric. 16:605–613. doi:10.1016/S2095-3119(16)61441-7

Shaban, M. 2013. Biochemical aspects of protein changes in seed physiology and germination. Intl. J. Adv. Biol. Biom. Res. 1:885–898.

Shan, X., S. Zhang, H. Chen, R. Wang, E. Li, and J. Wang. 2021. Effect of PEG priming on seed germination and seedling physiological indexes in onion. J. North. Agric. 49(2):129−134. doi:10.12190/j.issn.2096-1197.2021.02.20

Silva, T. C. F. S., R. C. B. Silva, J. E. S. B. Silva, R. S. Santos, C. A. Aragão, and B. F. Dantas. 2014. Germinação de sementes de melancia sob diferentes métodos de tratamento com reguladores vegetais. Sci. Plena 10(3):1–15. (in Portuguese)

Singh, P., A. Chatterjee, V. Bhatia, and S. Prakash. 2020. Application of laser biospeckle analysis for assessment of seed priming treatments. Comput. Electron. Agric. 169:105212. doi:10.1016/j.compag.2020.105212

Tabe, L., N. Hagan, and T. J. V. Higgins. 2002. Plasticity of seed protein composition in response to nitrogen and sulfur availability. Curr. Opin. Plant Biol. 5:212–217. doi:10.1016/s1369-5266(02)00252-2

Uçarlı, C. 2020. Effects of salinity on seed germination and early seedling stage. p.211–232. *in*: Abiotic Stress in Plants. (Fahad, S., S. Saud, Y. Chen, C. Wu, and D. Wang, eds.) IntechOpen. London, UK. 494 pp. doi:10.5772/intechopen.93647

Umebese, C. E. and A. E. Bankole. 2013. Impact of salicylic acid on antioxidants, biomass and osmotic adjustments in *Vigna unguiculata* L. Walp. during water deficit stress. Afr. J. Biotechnol. 12:5200–5207. doi:10.5897/AJB2013.12087

Weitbrecht. K, K. Müller, and G. Leubner-Metzger. 2011. First off the mark: Early seed germination. J. Exp. Bot. 62:3289–3309. doi:10.1093/jxb/err030

Wojtyla, Ł., K. Lechowska, S. Kubala, and M. Garnczarska. 2016. Molecular processes induced in primed seeds- Increasing the potential to stabilize crop yields under drought conditions. J. Plant Physiol. 203:116–126. doi:10.1016/j.jplph.2016.04.008

Xiao, D. 2018. Study on the pretreatment technology for eggplant seeds. Master Thesis. Northeast Agricultural University, Heilongjiang Province, China. 68 pp. (in Chinese)

Zhang, M., R. Dai, S. Zhang, and H. Jiang. 2017. Alleviation effects of seed soaking with H_2O_2 on seed germination in rape under low temperature stress. J. Nan-Jing Agric. Univ. 40:963–970. (in Chinese)

Effects of Different Concentrations of Osmotic Treatment on the Seed Germination of Varied Varieties of Rootstock Eggplant at Low Temperature

Yi-Jing Chen[1], Chwen-Ming Yang[2,3,4], and Kai-Ying Chiu[5,*]

Abstract

Chen, Y. J., C. M. Yang, and K. Y. Chiu. 2023. Effects of different concentrations of osmotic treatment on the seed germination of varied varieties of rootstock eggplant at low temperature. J. Taiwan Agric. Res. 72(3):255–265.

Previous studies have shown that growth regulators or some osmotic chemicals (such as salicylate) can be used in the osmotic treatment of seeds to increase the percentage and uniformity of germination and shorten the time required for germination, and even induce resistance to antibiotics and biotic stresses. This experiment was to use different concentrations of salicylic acid (SA) to osmotically treat the seeds of rootstock eggplant varieties ‘A105’ and ‘A108’, at 15℃ for future application. The results showed that the seed germination percentage (GP) of the control check (CK) of variety ‘A105’ reached 98.67%, and the value did not increase significantly after being treated with solutions of different concentrations of SA. The GP of CK seeds was only 74.67% for variety ‘A108’. After osmosis treatment with different concentrations of SA, the GPs were greatly increased, but no significant difference was observed among different concentrations. The mean germination time (MGT) of the two varieties was significantly shortened after SA treatment, in which ‘A105’ was shortened from 8.78 d of CK to 5.72 d under the treatment of 0.01 mM concentration, and the MGT of ‘A108’ was shortened from 11.99 d of CK to 8.97 d under the treatment of 0.05 mM. showing difference between varieties. With or without the osmosis treatment, the seeds of the variety ‘A105’ quickly absorbed water after soaking until reaching the saturation point in 12 h. There is no significant difference between the osmosis treatments and CK in the first 72 h, and a second wave of rapid water absorption occurred after 72 h. Seeds of the variety ‘A108’ also reached the saturation point at 12 h; however, there was no difference between the osmotic adjustment treatments and CK. No second wave of rapid water absorption appeared until 120 h. The value of leakage electrical conductivity (EC) of CK seeds of ‘A105’ increased rapidly after soaking in water, but decreased significantly after SA treatment. For CK seeds of ‘A108’, EC value increased slowly after soaking in water, and then began to decrease after 6 h. The soluble protein of CK seeds in ‘A105’ increased significantly after water immersion for 1 d, and increased again at Day 3. In contrast, the protein content of SA-treated seeds slowly increased until the seventh day. Without SA treatment, the protein content in seeds of ‘A108’ began to increase on the 1st day after soaking, and did not increase until 7 d after immersion. In summary, osmosis treatment with SA solutions has a positive effect on the germination of the tested eggplant varieties, including increasing the GP, shortening the MGT, accelerating water absorption, reducing the value of leakage EC and increasing soluble protein of seeds. The varietal differences were found in these traits.

Key words: Osmotic treatment, Salicylic acid, Rootstock eggplant, Seed germination, Low temperature.

Received: February 13, 2023; Accepted: May 3, 2023.

* Corresponding author, e-mail: cky@mdu.edu.tw
[1] Project Assistant, Department of Smart and Quality Agriculture, MingDao University, Changhua County, Taiwan, ROC.
[2] Visiting Professor, Department of Smart and Quality Agriculture, MingDao University, Changhua County, Taiwan, ROC.
[3] Chair Professor, Department of Smart and Quality Agriculture, MingDao University, Changhua County, Taiwan, ROC.
[4] Director, Smart Farming Research Center, MingDao University, Changhua County, Taiwan, ROC.
[5] Professor, Department of Smart and Quality Agriculture, MingDao University, Changhua County, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 72(3):267–275 (2023)
DOI:10.6156/JTAR.202309_72(3).0006 研究報告

小花蕙蘭假球莖腐敗病菌感染途徑之研究

黃巧雯 [1] 黃晉興 [2,*] 李怡靜 [3] 陳純葳 [4] 賴思倫 [5] 謝廷芳 [6]

摘要

黃巧雯、黃晉興、李怡靜、陳純葳、賴思倫、謝廷芳。2023。小花蕙蘭假球莖腐敗病菌感染途徑之研究。台灣農業研究 72(3):267–275。

由 *Fusarium oxysporum* 引起的假球莖腐敗病 (pseudobulb rot) 是台灣小花蕙蘭 (Oriental cymbidiums) 栽培的重要限制因子之一。農友為縮短植株生長期一般不採用組培苗，而是以慣行栽培之分芽繁殖為主，本研究嘗試比較組培苗、健株苗、病株苗及病株之第一代、第二代及第三代分株苗對假球莖腐敗病發生之影響，結果發現病株第一代分株苗移栽於盛有碎石栽培盆中，假球莖腐病的發病率高達 100%；且病株第二代與第三代分株苗移栽後，其植株發病率仍為中等偏高，顯示病株苗或來自罹病植株之分株苗，為本病害重要感染源之一，因此採用健康分株苗為防治本病害之重要策略。小花蕙蘭假球莖腐敗病菌分離株 (*F. oxysporum* Fo-50) 可在幼嫩與成熟假球莖傷口接種時，造成組織黑褐化腐敗病徵。另外，本研究進行傷口對假球莖腐敗病發生之影響試驗，結果發現剪根、假球莖針刺傷口及分拆分株苗產生傷口之植株接種假球莖腐敗病菌 (*F. oxysporum* Fo-50, Fo-51) 其發病率皆為 100%，顯著高於無傷口處理植株 (25% 或更低)，顯示傷口為病害發生的重要因素。接著進一步接種試驗中，於「寶山報歲蘭」或「玉華四季蘭」品種中，將植株分拆產生傷口後 3、7 及 28 d 之分株苗，接種假球莖腐敗病菌 (*F. oxysporum* Fo-50, Fo-51)，其發病率分別為高 (75.0–100%)、中 (50–75%) 及低等 (12.5–25%)。本研究結果可作為後續研擬小花蕙蘭假球莖腐敗病防治策略之重要參考依據。

關鍵詞：小花蕙蘭、假球莖腐敗病、鐮孢病菌、發病生態。

前言

小花蕙蘭 (又稱國蘭或東洋蘭) 為蘭科 (Orchidaceae)、蕙蘭屬 (*Cymibidium* spp.) 多年生草本植物，為蕙蘭屬中的建蘭 (或稱四季蘭)、報歲蘭、春蘭、寒蘭及九華蘭等植物的統稱，原產於亞熱帶地區，株型及花型較小，與大花型的大花蕙蘭 (虎頭蘭或東亞蘭) 具區別性 (Lo 2006; Hung *et al*. 2010)。目前台灣國蘭栽種面積約 70–100 ha，多數以雙層遮陰網室栽培，主要產地在南投 (29%)、嘉義 (26%)、台中 (20%)、雲林 (13%)、屏東 (4%) 及高雄 (3%) 等縣市。台灣所培育的小花蕙蘭以外銷為主，2011–2021 年小花蕙蘭每年外銷量在 450–680 Mg 間，外銷產值在 500–950 萬美元間 (財政部關務署統計資料庫，https://portal.sw.nat.gov.tw/APGA/GA35)，為台灣出口產值僅次於蝴蝶蘭與文心蘭之第三大蘭花產業。主要以裸根苗株形態，透過貿易商與中盤商輸銷韓國 (75%) 與中國大陸 (24%)，年銷售量約 2 千 4 百萬株，其中以四季蘭 (53%)、報歲蘭 (36%)、春蘭 (6%) 及其他小花蕙蘭 (5%) 等為主 (Lin 2015)。

投稿日期：2023 年 3 月 23 日；接受日期：2023 年 5 月 8 日。
[*] 通訊作者：jhhuang@tari.gov.tw
[1] 農業部農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農業部農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。
[3] 農業部農業試驗所植物病理組計畫助理。台灣 台中市。
[4] 農業部農業試驗所植物病理組聘用助理研究員。台灣 台中市。
[5] 農業部農業試驗所花卉試驗分所產程開發系助理研究員。台灣 雲林縣。
[6] 農業部農業試驗所研究員兼主任秘書。台灣 台中市。

根據《台灣植物病害名彙》(Tzean *et al*. 2019) 紀錄，台灣小花蕙蘭主要病害包括蕙蘭嵌紋病毒 (*Cymbidium mosaic virus*; CymMV) 與齒舌蘭輪斑病毒 (*Odontoglossum rigspot virus*; ORSV)；真菌性病害包括灰黴病 (*Botrytis cinerea*)、炭疽病 (*Colletotrichum gloeosporioides*)、葉枯病 (*Phyllosticta cymbidii*)、疫病 (*Phytophthora palmivora*、*P. multivesiculata*、*P. nicotianae*)、細斑病 (*Fusarium proliferatum*、*F. verticillioides*) 及假球莖腐敗病 (*F. oxysporum*)；細菌性病害為軟腐病 (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*)；線蟲則為葉芽線蟲 (*Aphelenchoides besseyi*、*A. bicaudatus*)、根瘤線蟲 (*Meloidogyne incognita*) 及南方根腐線蟲 (*Pratylenchus coffeae*)。其中由 *F. oxysporum* 引起的假球莖腐敗病 (pseudobulb rot) 則為限制台灣小花蕙蘭栽培之重要病害 (Huang *et al*. 2020)，造成假球莖組織黑褐化腐敗，進而導致地上部葉片黃化、萎凋及掉葉等現象，嚴重時假球莖連接根部組織亦出現褐化腐爛，腐爛蔓延至鄰近相連的假球莖或幼芽。台灣栽培業者習慣以分芽 (株) 繁殖為主，易造成分株苗移植後不久植株出現相同病害，嚴重影響移植存活率與收益。為了進一步釐清小花蕙蘭假球莖腐敗病發病生態，本研究針對假球莖腐敗病菌之傳播特性進行相關研究，期能掌握本病害主要感染源與傳播途徑，作為未來防治本病害之參考依據。

材料與方法

病原菌分離與保存

將田間罹患假球莖腐敗病之小花蕙蘭植株攜回實驗室，直接將罹病植株之假球莖病健部組織，以 0.5% (v/v) 次氯酸鈉漂洗消毒 30 s，繼而以 75% (v/v) 酒精消毒 30 s，最後再以無菌水漂洗 2 次；自然風乾後，利用滅菌過之解剖刀切取病健部相鄰組織置於 2% (w/v) 水瓊脂培養基 (water agar; WA) 上分離，將培養基置於室溫下 4–5 d，其分離所得之菌株置於馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (potato dextrose agar; PDA) 中純化後，待其產孢後進行單孢分離，所得之分離株依據 Leslie *et al*. (2006) 與 Geiser *et al*. (2004) 之形態特徵及分子鑑定為 *F. oxysporum*；將分離株保存於 PDA 斜面培養基與無菌水保存管中，置於 10℃保存備用。本研究使用供試菌株來源如下：Fo-50 菌株分離自台中市大甲區之四季蘭罹病植株，Fo-51 菌株分離自南投縣魚池鄉之四季蘭罹病植株。

不同來源分株苗之假球莖腐敗病原分離率

本試驗供試品種為「玉華四季蘭」(*C. ensifolium* ‘Yu-hua’)。供試組培苗來自市售之小花蕙蘭組織培養苗，健株苗與病株苗為分別由南投縣魚池鄉王氏與蘇氏 2 個園區所採集健康植株與罹病植株的分株苗，健株苗來自健康植株的假球莖旁第一代假球莖，病株苗來自罹病植株的假球莖；病株之第一代分株苗來自罹病植株的假球莖旁第一代假球莖；病株之第二代分株苗為罹病植株的假球莖株旁第二代假球莖；病株之第三代則為第三代假球莖。所收集來自不同來源的分株苗其假球莖與根系以 0.5% (w/v) 次氯酸鈉漂洗消毒 30 s，繼而以 75% 酒精消毒 30 s，最後再以無菌水漂洗 2 次，自然風乾後，利用滅菌過解剖刀剖開假球莖與根系部位，隨機切取內部組織置於 2% (w/v) WA 上培養 4–5 d，以光學顯微鏡 (Leica DM 2500, Leica, Wetzlar, Germany) 觀察鐮孢菌孢子著生方式與孢子形態，分離所得之菌株，單孢分離後移植至 PDA 中，進行菌落形態觀察，鑑定所分離的鐮孢菌菌株。計算 *F. oxysporum* 之分離率 (Isolation, %) = (由假球莖或根系分離出 *F. oxysporum* 之分株苗數/全部調查之分株苗數) × 100%。每處理為 50 株。

不同來源分株苗對假球莖腐病發生之影響

供試分株苗的來源如上述，將不同來源的分株苗，分別種植於盛有碎石栽培盆內，每處理 10 盆，共 3 重複，置於溫室內每天正常澆水管理，每週觀察並記錄發病情形，直到 12 wk 為止，本試驗重複 2 次。假球莖腐敗病之發病率計算公式如下：發病率 (Disease incidence, %) = (植株地上部或假球莖出現腐敗病徵之罹病植株數/調查植株之總數) × 100%。

幼嫩與成熟假球莖對小花蕙蘭假球莖腐敗病菌之感病性測定

將由小花蕙蘭假球莖腐敗病組織分離之 *F. oxysporum* 菌株 Fo-50 分離株培養於 PDA 培養基上，5–7 d 後，以無菌水將 PDA 上所產生之孢子洗下，製成孢子懸浮液 (1×10^6 spores mL^{-1}) 以供接種試驗。供試植物來自市售的「寶山報歲蘭」 (*C. sinense* 'Bao-shan') 與「玉華四季蘭」 (*C. ensifolium* 'Yu-hua')，置於溫室內正常管理至少 1 年時間確定植株健康後，選取幼嫩與成熟不同齡期假球莖後，先以沾有 75% 酒精的棉花擦拭組織表面進行消毒，再以無菌之針頭於接種處上針刺製造傷口，爾後以直徑長度約 2 cm 之棉花沾溼供試菌株孢子懸浮液後，分別覆蓋於已針刺製造傷口之假球莖上，再以透氣膠帶 (Nexcare, 3M micropore, 3M, Saint Paul, MN, USA) 黏貼於接種部位上方，每個處理接種 5 株供試植株，並以棉花沾溼無菌水作為對照組，接種後每週觀察記錄病徵發展情形。

傷口對小花蕙蘭假球莖腐敗病發生之影響

將供試菌株 *F. oxysporum* Fo-50 與 Fo-51 分離株分別培養於 PDA 培養基上，5–7 d 後以無菌水將 PDA 上所產生之孢子洗下並稀釋成 1×10^6 spore mL^{-1} 孢子懸浮液備用。供試植物來自市售的「寶山報歲蘭」 (*C. sinense* 'Bao-shan') 與「玉華四季蘭」 (*C. ensifolium* 'Yu-hua')，置於溫室內正常管理至少 1 年時間以確定植株健康。本試驗將健康植株分為 4 個處理組，包括無人為傷口、假球莖針刺傷口、剪去 1/4 根長及分拆分株苗之傷口，分別栽種於盛有碎石栽培盆內，每盆澆灌 10 mL 孢子懸浮液於植株假球莖基部；對照組則澆無菌水，每處理 5 盆，共 3 重複，置於溫室內每天正常澆水管理與每週觀察發病情形，直到 12 wk 為止並記錄發病率，本試驗重複 2 次。

不同時間點的分株苗傷口對小花蕙蘭假球莖腐敗病發生之影響

供試菌株與健康植株如上述，本試驗分為以下 5 個處理組，包括當天分拆分株苗，以及分拆後第 3、7、14 及 28 d 的分株苗，分別種植於盛有碎石栽培盆內，每盆澆灌 10 mL 孢子懸浮液於植株假球莖基部；對照組則澆無菌水，每處理 5 盆，共 3 重複，置於溫室內每天正常澆水管理與每週觀察發病情形，直到 12 wk 為止並記錄發病率，本試驗重複 2 次。

統計分析

各項處理之試驗資料利用 SAS Enterprise Guide 7.1 版統計分析軟體先進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)，再以最小顯著性差異 (least significant difference; LSD) 測驗，在 5% 顯著水準下比較處理間平均值之差異。

結果

不同來源分株苗之假球莖腐敗病原分離率

本研究自市售之組培苗及南投縣魚池鄉王氏與蘇氏 2 個園區 (Experiment 1 與 Experiment 2) 取得之健株苗、病株苗及病株之第一代、第二代及第三代分株苗進行假球莖腐敗病菌 *F. oxysporum* 之病原分離，結果如表 1 所示，組培苗 2 次採樣中均未分離到 *F. oxysporum* 病原；第一次試驗中健株苗、病株苗及病株之第一代、第二代及第三代分株苗之分離率分別為 9.3%、100.0%、93.3%、54.7% 及 31.3%，而在第二次試驗採樣分離率則分別為 3.3%、100.0%、95.3%、49.3% 及 24.7%。以上試驗，病株苗與病株之第一代分株苗之分離率數值皆無顯著差異，其他處理組間則有具顯著差異。

不同來源分株苗對假球莖腐病發生之影響

比較組培苗、健株苗、病株苗、病株之第一代、第二代及第三代分株苗對小花蕙蘭假球莖腐敗病發生影響，試驗結果如表 1 所示，組培苗種植於盛有碎石栽培盆內，兩次試驗之假球莖腐敗病發病率皆為 0，若將健株苗種植後，兩次試驗之假球莖腐敗病發病率分別為 16.7% 與 10.0%；若將病株之第一代分株苗種植後，兩次試驗之假球莖腐敗病發生率皆為 100.0%，與病株苗種植後之植株 100% 之發病率無顯著性差異；若將病株之第二代分株苗種植後，兩次試驗之假球莖腐敗病發病率分

表 1. 小花蕙蘭組培苗、健株苗、病株苗及病株分株苗的假球莖腐敗病菌分離率，以及再種植的發病率。

Table 1. Pathogen isolation rates of plantlets and disease incidence of replanted Oriental cymbidiums which were infected by *Fusarium oxysporum* causing pseudobulb rot.

Plant source	Experiment 1		Experiment 2	
	Isolation rate (%) of pathogen from plantlet[z]	Disease incidence (%) of replanted plants[y]	Isolation rate (%) of pathogen from plantlet	Disease incidence (%) of replanted plants
Tissue culture plantlet	0.0 e[x]	0.0 e	0.0 d	0.0 d
Healthy plantlet	9.3 d	16.7 d	3.3 d	10.0 d
Disease plantlet	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a
The 1st generation shoot from the diseased plant	93.3 a	100.0 a	95.3 a	100.0 a
The 2nd generation shoot from the diseased plant	54.7 b	73.3 b	49.3 b	76.7 b
The 3rd generation shoot from the diseased plant	31.3 c	46.7 c	24.7 c	43.3 c

[z] Isolation rate (%) = (Number of pseudobulbs or root colonized by *Fusarium oxysporum*/Total number of plantlets) × 100%.
[y] Disease incidence (%) = (Number of plants which showed symptom of pseudobulb rot/Total number of plants) × 100%.
[x] Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% by least significant difference (LSD) test.

別為 73.3% 與 76.7%；若將病株之第三代分株苗種植後，兩次試驗發病率分別為 46.7% 與 43.3%，與其他處理組間呈現顯著性差異。

幼嫩與成熟假球莖對小花蕙蘭假球莖腐敗病菌之感病性測定

將假球莖腐敗病菌 Fo-50 菌株孢子懸浮液，分別接種在幼嫩與成熟假球莖，每週觀察病徵表現，結果發現於接種後 3 wk，幼嫩與成熟假球莖之葉莖部仍正常，只有在接種處內部組織開始出現些微黑褐化壞疽病斑 (圖 1A、1C)。接種後 5 wk，幼嫩假球莖之葉莖部出現褐化病徵，假球莖內部組織黑褐化腐敗，並延伸到鄰近相連假球莖 (圖 1B)；成熟假球莖之葉片則出現些微黃葉病徵，其內部組織出現黑褐化腐敗並延伸到鄰近假球莖 (圖 1D)，此病徵經過病原分離後仍可分離到 *F. oxysporum*。

傷口對小花蕙蘭假球莖腐敗病發生之影響

將假球莖腐敗病菌 Fo-50 與 Fo-51 兩菌株孢子懸浮液分別接種於「寶山報歲蘭」(*C. sinense* ‘Bao-shan’) 與「玉華四季蘭」(*C. ensifolium* ‘Yu-hua’) 之無人為傷口、假球莖針刺傷口、剪去 1/4 根長及分拆分株苗之傷口植株，置於溫室內 12 wk 後，結果如表 2 所示。以「寶山報歲蘭」品種而言，將兩菌株分別接種於剪去 1/4 根長、假球莖針刺傷口及分拆分株苗所產生傷口的植株，其假球莖腐敗病之發病率皆為 100%；將 Fo-50 與 Fo-51 兩菌株分別接種於無人為傷口的植株，其發病率皆為 25.0%，相對於將菌接種於有傷口植株處理的表現，兩者之間具顯著性差異。另以「玉華四季蘭」品種而言，將兩菌株分別接種於剪去 1/4 根長、假球莖針刺傷口及分拆分株苗所產生傷口的植株，其假球莖腐敗病之發病率皆為 100%；將 Fo-50 與 Fo-51 兩菌株接種於無人為傷口的植株，其發病率分別為 12.5% 與 25.0%，相對於將菌接種於有傷口植株處理的表現，兩者之間具顯著性差異，對照組以無菌水接種其發病率皆為 0。

不同時間點的分株苗傷口對小花蕙蘭假球莖腐敗病發生之影響

將假球莖腐敗病菌 Fo-50 與 Fo-51 兩菌株孢子懸浮液，分別接種於「寶山報歲蘭」與「玉華四季蘭」之不同時間點的分株苗，包括當天分拆分株苗與分拆後 3、7、14 及 28 d 的分株苗，置於溫室內 12 wk 後，結果如表 3 所示。以「寶山報歲蘭」品種而言，兩菌株接種在當天分拆的分株苗傷口時，植株發病率皆為 100%，然於分拆後 3、7、14 及 28 d 的分株苗傷口接種 Fo-50 分離株時，其假球莖腐敗病發病率分別為 100%、50.0%、50.0% 及 25.0%；接種 Fo-51 分離株之發病率分別為 75.0%、50.0%、25.0% 及 12.5%。另外，以「玉華四季蘭」品種而言，在當天分拆分株苗

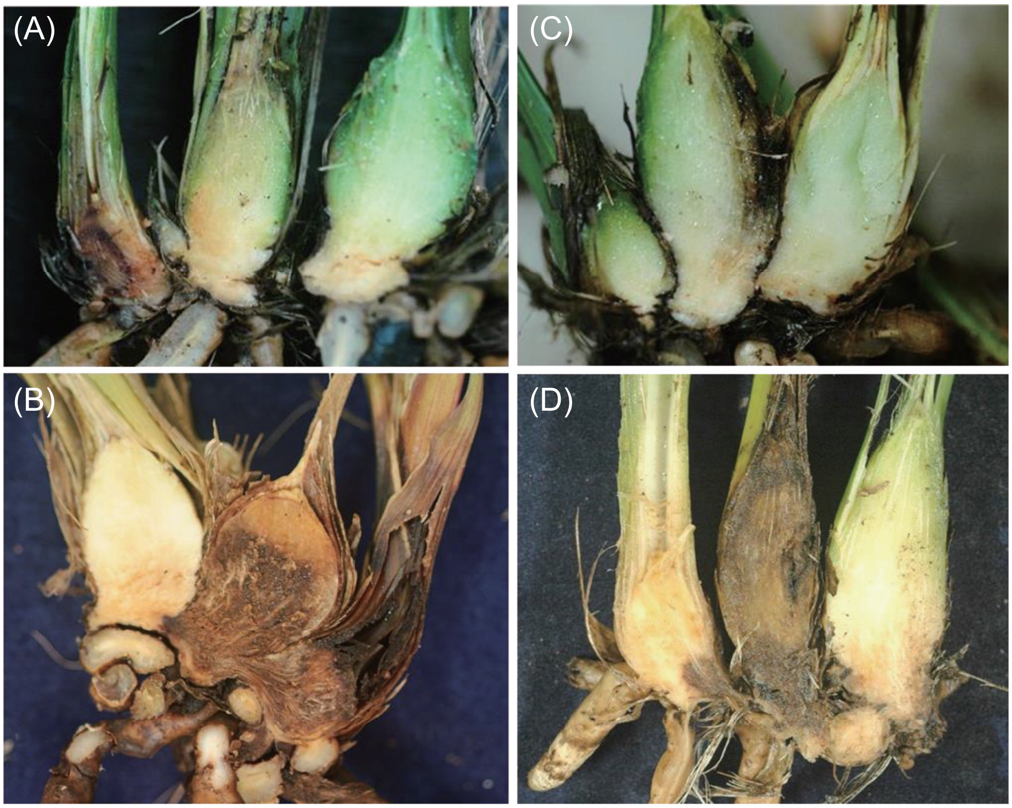


圖 1. 幼嫩與成熟假球莖對小花蕙蘭假球莖腐敗病菌 (*Fusarium oxysporum*) 之病原性測定。(A、B) 健康幼嫩假球莖與 (C、D) 成熟假球莖，接種 *F. oxysporum* Fo-50 之 (A、C) 3 wk 與 (B、D) 5 wk 後之病徵表現。

Fig. 1. Pathogenicity tests of *Fusarium oxysporum* on Oriental cymbidiums. Symptoms of (A, B) young and (C, D) mature pseudobulbs by inoculation with *F. oxysporum* Fo-50 on the wounded pseudobulbs (A, C) 3 wk and (B, D) 5 wk after inoculation.

表 2. 傷口對小花蕙蘭假球莖腐敗病發生之影響。

Table 2. Effect of wounds on the disease incidences of Oriental cymbidiums pseudobulb rot inoculated with *Fusarium oxysporum* Fo-50 and Fo-51 isolates for 12 wk.

	Disease incidence (%)[z]			
	C. sinense 'Bao-shan'		*C. ensifolium* 'Yu-hua'	
Treatment	Fo-50	Fo-51	Fo-50	Fo-51
no-wound	25.0 b[y]	25.0 b	12.5 b	25.0 b
roots-wounded	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a
pseudobulbs-wounded	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a
seedlings-wounded	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a

[z] Disease incidence (%) = (Number of plants which showed symptom of pseudobulb rot/Total number of plants) × 100%.
[y] Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% by least significant difference (LSD) test.

與分拆後 3 d 的分株苗傷口接種兩菌株時，發病率皆達 100% 無差異性；然對分拆後 7、14 及 28 d 的分株苗傷口接種 Fo-50 分離株時，其假球莖腐敗病發病率分別為 62.5%、50.0% 及 25.0%；接種 Fo-51 分離株則其發病率分別為 75.0%、37.5% 及 12.5%，相對於當天分拆

表 3. 分株苗產生傷口後於不同天數接種病原菌，對小花蕙蘭假球莖腐敗病發生之影響。

Table 3. Effect of inoculation timing of *Fusarium oxysporum* Fo-50 and Fo-51 to the pseudobulbs separated from the mother plants on disease incidence of pseudobulb rot of Oriental cymbidiums 12 wk after inoculation.

	Disease incidence (%)[z]			
	C. sinense 'Bao-shan'		*C. ensifolium* 'Yu-hua'	
Days after pseudobulbs were sepatated	Fo-50	Fo-51	Fo-50	Fo-51
0	100.0 a[y]	100.0 a	100.0 a	100.0 a
3	100.0 a	75.0 a	100.0 a	100.0 a
7	50.0 b	50.0 b	62.5 b	75.0 b
14	50.0 b	25.0 bc	50.0 b	37.5 c
28	25.0 c	12.5 c	25.0 c	12.5 d

[z] Disease incidence (%) = (Number of plants which showed symptom of pseudobulb rot/Total number of plants) × 100%.
[y] Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% by least significant difference (LSD) test.

分株苗傷口達 100% 發病率，兩者之間具顯著性差異。

討論

小花蕙蘭為台灣第三大外銷花卉，是具經濟重要性的其中一類蘭花植物 (Hung *et al*. 2015)，透過本研究之田間病害調查顯示，由 *Fusarium oxysporum* 引起的小花蕙蘭假球莖腐敗病 (pseudobulb rot) 普遍發生於栽培園區，嚴重時發病率達 50%。Yao *et al*. (2018) 指出在 2016 年中國福建省由 *F. oxysporum* 引起的四季蘭 (*Cymbidium ensifolium*) 莖腐病 (stem rot) 發生率為 15–35%，顯示本病害為限制小花蕙蘭栽培生產的重要病害之一 (Huang *et al*. 2020)。*F. oxysporum* 寄主範圍廣泛，包含菊花屬 (*Chrysanthemum* spp.)、石竹屬 (*Dianthus* spp.)、非洲菊屬 (*Gerbera* spp.)、唐菖蒲屬 (*Gladiolus* spp.) 及百合屬 (*Lilium* spp.) 等具觀賞價值的植物，此病原主要危害儲藏器官之球莖部位 (storage of bulbs and corms)，而後呈現維管束萎凋 (vascular wilt)、球莖與根部腐爛 (crown and root rot) 兩種病徵表現，造成許多高經濟價值觀賞植物的嚴重經濟損失 (Lecomte *et al*. 2016; Srivastava *et al*. 2018)，如 *F. oxysporum* f. sp. *gladiodi* 造成墨西哥的唐菖蒲 (*gladiodi*) 60–80% 損失 (Barrera-Necha *et al*. 2009)。另 Lee *et al*. (2002) 指出 1996–2000 年間在韓國的蕙蘭屬 (*Cymbidium*) 植物出現葉片基部、假球莖及根部枯萎、腐爛病徵之發生率高達 40%，其中 *F. oxysporum* 為主要的病原菌，顯示 *F. oxysporum* 是多種具經濟價值作物的重要病原菌之一 (Gullino *et al*. 2015; Lecomte *et al*. 2016; Srivastava *et al*. 2018)。*F. oxysporum* 是一種複合種 (complex species) 其寄主範圍廣泛，因 *F. oxysporum* 通常具寄主專一性 (host-specificity) 特性，可再細分為分化型 (*formae specialis*) 與小種 (races)，目前已超過 70 種 *forma speciales* (Armstrong & Armstrong 1981; Srivastava *et al*. 2018)，Huang *et al*. (2020) 指出 *F. oxysporum* 引起小花蕙蘭假球莖腐敗病外，在大花蕙蘭-虎頭蘭亦造成類似病徵，但在文心蘭、仙履蘭、嘉得麗雅蘭及石斛蘭等蘭花則未見病徵產生，推測可能具有分化型存在，未來仍有待釐清。

本研究為瞭解本病害之主要感染源與感染途徑，由試驗結果顯示病株苗之假球莖腐敗病菌分離率達 100.0%，將病株苗種植於盛有碎石栽培盆內，假球莖腐敗病之發病率亦達 100.0%；健株苗之假球莖腐敗病菌分離率約 3.3–9.3%，將健株苗種植後，假球莖腐敗病之發病率則為 10.0–16.7%；組培苗之假球莖腐敗病菌分離率為 0，將組培苗種植後，假球莖腐敗病之發病率為 0，顯示栽植健康分株苗甚為重要，分株苗為本病害傳播之主要途徑，因此防治本病害首重取得健康的分株苗。分株苗來源最好來自組織培養苗，才能有效降低苗株被感染風險，但由於目前小花蕙蘭組織培養增殖倍率低，且所需時間長、成本相較一般分

株苗高，因此台灣栽培業者仍以分芽繁殖小花蕙蘭苗株為主 (Du Puy & Cribb 2007; Hsu 2010)。此外，病株之第一代、第二代及第三代分株苗之假球莖腐敗病菌分離率，分別有 93.0–95.0%、49.0–54.0% 及 24.0–31.0%，將病株之第一代、第二代及第三代分株苗分別種植於盛有碎石栽培盆內，其假球莖腐敗病發病率分別為 100.0%、75.0% 及 45.0%，調查得知分株苗隨著罹病植株的假球莖分化多代，腐敗病發病率則降低，但仍有 4 成以上發病率，顯示種植來自罹病植株之分株苗，後續在田間發生假球莖腐敗病的風險亦相當高。另據文獻紀錄作物萎凋病 (Fusarium diseases)，如仙客來萎凋病 (cyclamen wilt) 與康乃馨、球莖作物及菊科萎凋病 (Tompkins & Snyder 1972; Gullino *et al*. 2015; Garibaldi & Gullino 2017) 等，皆可透過種子 (seeds, seed debris) 或繁殖材料 (propagation material) 進行病害傳播，故建議業者栽植小花蕙蘭時，應選擇來自組培苗或健康植株的分株苗。另本研究將假球莖腐敗病菌 Fo-50 孢子懸浮液，直接接種於幼嫩與成熟假球莖上，由結果顯示對幼嫩或成熟的假球莖內部組織，皆會造成黑褐化腐敗並延伸至鄰近假球莖，在地上部的葉片則出現黃化病徵，顯示只要假球莖腐敗病菌存在於假球莖內部，無論是幼嫩或成熟的假球莖，皆會呈現典型假球莖腐敗病的病徵。

目前台灣種植小花蕙蘭以慣行的分芽繁殖方式為主，分株時會造成分株苗產生傷口，本研究發現無論剪去 1/4 根長、假球莖針刺傷口及分拆分株苗所產生之傷口等植株，直接接種假球莖腐敗病菌 (Fo-50、Fo-51) 12 wk 後，「寶山報歲蘭」與「玉華四季蘭」之發病率皆為 100.0%，而無傷口處理之植株發病率僅 12.5–25.0%，且多發生於幼株，顯示病原菌易由傷口侵入感染，且無傷口植株之幼株較成株易感病。另在不同時間點的分株苗傷口上接種假球莖腐敗病菌 (Fo-50、Fo-51) 時，12 wk 後發現當天分拆分株苗與分拆後 3 d 之分株苗，無論是「寶山報歲蘭」或「玉華四季蘭」，其發病率皆在 75.0–100% 之間，推測可能原因為當天分拆分株苗較衰弱或傷口未癒合完全，以致較易受病原菌感染，尤其以分拆 3 d 內的分株苗最易感染病原菌；而分拆後 7 d 的分株苗仍有 5 成以上發病率；然而，分拆後 28 d 之「寶山報歲蘭」與「玉華四季蘭」2 品種分株苗，其發病率皆小於 20%，顯示分拆後分株苗放置陰涼處時間越久，雖可達傷口癒合效果，但卻不符合目前台灣小花蕙蘭產業生產栽培現況。因此，未來應可再進行傷口處理的溫室與田間相關試驗，以確認保護傷口的最佳操作方法，作為農友處理分株苗的參考依據。

綜合本研究結果顯示，來自罹病植株之分株苗，為小花蕙蘭假球莖腐敗病傳播的主要來源，故建議栽培業者應選擇組培苗或健康植株的分株苗進行種植，而分拆分株苗植株較為衰弱，傷口未完全癒合，較易受到存活於介質中病原菌的危害，尤其以分拆 3 d 內分株苗最易感染病原菌，未來仍須持續進行分株苗傷口保護措施與其他防治方法 (如物理防治、化學防治及生物防治等) 等相關試驗，提供適當的防治策略，實際解決產業生產所面臨的瓶頸。

引用文獻

Armstrong, G. M. and J. K. Armstrong. 1981. *Formae speciales* and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. p.391–399. *in*: *Fusarium*: Disease, Biology, and Taxonomy. (Nelson, P. E., T. A. Toussoun, and R. J. Cook, eds.) Pennsylvania State University Press. University Park, PA. 457 pp.

Barrera-Necha, L. L., Garduno-Pizana, C., Garcia-Barrera, L. J. 2009. *In vitro* antifungal activity of essential oils and their compounds on mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (Massey) Snyder and Hansen. Plant Pathol. J. 8:17–21. doi:10.3923/ppj.2009.17.21

Du Puy, D. and P. Cribb. 2007. The Genus Cymbidium. Kew publishing. Royal botanic gardens, London, UK. 369 pp.

Garibaldi, A. and M. L. Gullino. 2017. *Fusarium* wilts of some ornamental compositae. p.205–211. *in*: Fusarium Wilts of Greenhouse Vegetable and Ornamental Crops. (Gullino, M. L., J. Katan, and A. Garibaldi, eds.) American Phytopathological Society. St. Paul, MN. 256 pp. doi:10.1094/9780890544822.024

Geiser D. M., M. del Mar Jiménez-Gasco, S. Kang, I. Makalowska, N. Veeraraghavan, T. J. Ward, N. Zhang, G. A. Kuldau, and K. O'Donnell. 2004. FUSARIUM-ID v.1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. Eur. J. Plant Pathol. 110:473–

479. doi:10.1023/B:EJPP.0000032386.75915.a0

Gullino M. L., M. L. Daughtrey, A. Garibaldi, and W. H. Elmer. 2015. *Fusarium* wilts of ornamental crops and their management. Crop Prot. 73:50–59. doi:10.1016/j.cropro.2015.01.003

Hsu, J. H. 2010. The role of pseudobulb in the birth of orchids. p.154–162. *in*: 99 Years Special Discussion Collection. (Tsai, Y. F., ed.) Taichung Dist. Agric. Res. Ext. Sta. Taichung, Taiwan. 248 pp. (in Chinese)

Huang, C. W., J. H. Huang, Y. C. Li, C. W. Chen, and T. F. Hsieh. 2020. Pseudobulb rot of *Cymbidium* caused by *Fusarium oxysporum*. J. Taiwan Agric. Res. 69:65–76. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR.202003_69(1).0005

Hung, H. C., F. M. Wei, and C. S. Chang. 2010. Chinese Orchids Production Operations Manual. Taichung Dist. Agric. Res. Ext. Sta. Taichung, Taiwan. 135 pp. (in Chinese)

Hung, H. C., M. L. Chen, and Y. F. Tsai. 2015. Chinese Cymbidium Industry Conference. Taichung Dist. Agric. Res. Ext. Sta. Taichung, Taiwan. 168 pp. (in Chinese)

Lin, C. L. 2015. Taiwan cymbidium industry overview. p.3–20. *in*: Proceeding of Chinese Cymbidium Industry Conference. November 17, 2015. Nantou, Taiwan. Taichung Dist. Agric. Res. Ext. Sta. Taichung, Taiwan. 168 pp. (in Chinese)

Lo, Y. F. 2006. Guidelines for cymbidium cultivation and management. p.43–55. *in*: Handbook of Cultivation and Management of Cymbidium. (Wang, C. L., F. Z. Li, and J. Y. Wong, eds.) Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Council of Agriculture, Executive Yuan. Taipei, Taiwan. 121 pp. (in Chinese)

Lecomte C., C. Alabouvette, V. Edel-Hermann, F. Robert, and C. Steinberg. 2016. Biological control of ornamental plant diseases caused by *Fusarium oxysporum*: A review. Biol. Control. 101:17–30. doi:10.1016/j.biocontrol.2016.06.004

Lee, B. D., W. G. Kim, W. D. Cho, and J. M. Sung. 2002. Occurrence of dry rot on *Cymbidium* orchids caused by *Fusarium* spp. in Korea. Plant Pathol. J. 18:156–160. doi:10.5423/PPJ.2002.18.3.156

Leslie, J. F., B. A. Summerell, and S. Bullock. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Iowa State University Press. Ames, IA. 388 pp.

Srivastava, S., C. Kadooka, and J. Y. Uchida. 2018. *Fusarium* species as pathogen on orchids. Microbiol. Res. 207:188–195. doi:10.1016/j.micres.2017.12.002

Tompkins, C. M. and W. C. Snyder. 1972. Cyclamen wilt in California and its control. Plant Dis. Rep. 56:493–497.

Tzean, S. S., K. C. Tzeng, C. A. Chang, T. T. Tsai, and H. F. Yen. 2019. List of Plant Diseases in Taiwan. 5th ed. Taiwan Phytopathology Society. Taichung, Taiwan. 329 pp. (in Chinese)

Yao, J. A., P. Huang, C. Z. Lan, and Y. D. Yi. 2018. Stem rot on *Cymbidium ensifolium* (Orchidaceae) caused by *Fusarium oxysporum* in China. Can. J. Plant Pathol. 40:105–108. doi:10.1080/07060661.2017.1411976

Study on the Pathway of Infection by Pathogen of Oriental Cymbidiums Pseudobulb Rot

Chiao-Wen Huang[1], Jin-Hsing Huang[2,*], Yi-Ching Li[3], Chun-Wei Chen[4], Szu-Lun Lai[5], and Ting-Fang Hsieh[6]

Abstract

Huang, C. W., J. H. Huang, Y. C. Li, C. W. Chen, S. L. Lai, and T. F. Hsieh. 2023. Study on the pathway of infection by pathogen of Oriental cymbidiums pseudobulb rot. J. Taiwan Agric. Res. 72(3):267–275.

Pseudobulb rot disease caused by *Fusarium oxysporum* is a major limiting factor of Oriental cymbidiums cultivation in Taiwan. In order to shorten the growth period, farmers usually use a shoot diving method for propagation instead of using tissue culture plantlets. However, the disease incidence of pseudobulb rot was up to 100% when the 1st generation shoot from the diseased mother plant were replanted in pots. Furthermore, the replanted plants of the 2nd and 3rd generation shoots from the diseased mother plants showed moderate high disease incidences, suggesting that the disease plantlets or generation shoots come from the disease plant were the major inoculum source. In the artificial inoculation tests, both the young and mature Oriental cymbidiums pseudobulbs showed similar disease incidence after individual inoculation with wound treatment. In another inoculation test, with wound treatment, including on roots, pseudobulbs, and seedlings, the inoculated plants showed 100% disease incidences, significantly higher than the no wound treatment (25% or less), indicating that wound was an important factor to promote the disease development. In the further inoculation tests, both of the most popular cultivars (*C. sinense* 'Bao-shan' cultivar and *C. ensifolium* 'Yu-hua' cultivar) showed high (75.0–100%), moderate (50–75%) and low (12.5–25%) disease incidence on the replanted plantlets 3, 7 and 28 days after pseudobulbs were separated, respectively. The results of this study provides an important reference for developing the further control measures of pseudobulb rot disease in Taiwan.

Key words: *Cymbidium*, Pseudobulb rot, *Fusarium oxysporum*, Disease ecology.

Received: March 23, 2023; Accepted: May 8, 2023.

* Corresponding author, e-mail: jhhuang@tari.gov.tw

1 Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

2 Associate Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

3 Project Assistant, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

4 Contract Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

5 Assistant Research Fellow, Department of Production Process Development, Floricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Yunlin County, Taiwan, ROC.

6 Research Fellow and Secretary General, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

Editorial Board

Editor-in-Chief

Hsieh, Ting-Fang
Office of the Secretary General, Taiwan Agricultural Research Institute

Deputy Editor-in-Chief

Shih, Hsien-Tzung
Division of Applied Zoology, Taiwan Agricultural Research Institute

Editors

Ann, Pao-Jen
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute

Chang, Ruey-Jang
Agricultural Chemicals Research Institute

Chang, Yung-Ho
Department of Food and Nutrition, Providence University

Chen, Chien-Chung
Division of Applied Zoology, Taiwan Agricultural Research Institute

Chen, Chiling
Division of Agricultural Chemistry, Taiwan Agricultural Research Institute

Chen, Iou-Zen
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University

Chen, Suming
Department of Bio-Industrial Mechatronics Engineering, National Taiwan University

Chung, Wen-Hsin
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University

Do, Yi-Yin
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University

Hou, Feng-Nan
Department of Entomology, National Chung Hsing University

Huang, Biing-Wen
Department of Applied Economics, National Chung Hsing University

Huang, Chao-Chia
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute

Huang, Jenn-Wen
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University

Huang, Yuh-Ming
Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University

Juang, Kai-Wei
Department of Agronomy, National Chiayi University

Ku, Hsin-Mei
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Kuo, Bau-Jeng
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Lin, Huey-Ling
Department of Horticulture, National Chung Hsing University

Lin, Yann-Rong
Department of Agronomy, National Taiwan University

Liu, Li-Yu
Department of Agronomy, National Taiwan University

Lu, Hsiu-Ying
Miaoli District Agricultural Research and Extension Station

Lu, Kuang-Hui
Department of Entomology, National Chung Hsing University

Tsay, Jyh-Rong
Taiwan Agricultural Research Institute

Tzou, Yu-Min
Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University

Wang, Chan-Sen
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Yang, Chwen-Ming
Department of Post Modern Agriculture, MingDao Unviersity

Yang, Jeng-Tze
Department of Entomology, National Chung Hsing University

Yen, Gow-Chin
Department of Food Science and Biotechnology, National Chung Hsing University

Invited Editor

Yang, Chin-Ying
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

English Editorial Board

Chang, Chung-Jan
Department of Plant Pathology, University of Georgia, USA

Chung, Kuang-Ren
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University

Wang, Yin-Tung
Department of Horticultural Sciences, Texas A&M University, USA

Yang, Chin-Cheng Scotty
Department of Entomology, Virginia Polytechnic Institute and State University, USA

Editorial Assistants

Huang, Yu-Chun
Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research

Wang, Li-Jung
Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol. 72 No. 3 September 30, 2023

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Ministry of Agriculture

Publisher	Hsueh-Shih Lin
Editor-in-Chief	Ting-Fang Hsieh
Address	No.189, Zhongzheng Rd., Wufeng Dist., Taichung City 413008, Taiwan, ROC
Website	https://www.tari.gov.tw/jtar; E-mail: jtar@tari.gov.tw; Tel: +886-4-2331-7236
Submission	https://www.ipress.tw/J0042
Press	Ainosco Press
Address	18F, No.80, Sec.1, Chenggong Rd., Yonghe Dist., New Taipei City 234634, Taiwan, ROC
Tel	+886-2-2926-6006
E-mail	press@airiti.com
Price	NT$ 175 (per copy)
Distributor	1. GB Books / 1F., No.209, Songjiang Rd., Taipei City 104472, Taiwan, ROC GB Website: http://www.govbooks.com.tw; Tel: +886-2-2518-0207 2. Wunan Books / No.6, Zhongshan Rd., Taichung City 400002, Taiwan, ROC; Tel: +886-4-2226-0330